

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie  
und  
der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Plazentareifung beim Rind und Retentio secundinarum  
-Morphologisch-funktionelle Untersuchungen-**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)**  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Tobias Winter  
aus Bad Dürkheim/Pfalz

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon  
Prof. Dr. Axel Sobiraj

Gutacher: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon  
Institut für Veterinär-Pathologie der  
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Sobiraj  
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der  
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

apl. Prof. Dr. habil. Uwe Gille  
Riemannstraße 32  
04107 Leipzig

PD Dr. Dr. habil. Wolfgang Zaremba  
Söhreweg 6  
34639 Schwarzenborn

Tag der Verteidigung: 04.09.2007

**Meiner Familie**  
und  
**meiner geliebten Nina**





<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Der Aufbau des bovinen Uterus.....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Nicht gravider Uterus.....	2
2.1.2	Gravider Uterus (Plazenta).....	2
<b>2.2</b>	<b>Physiologie und Pathologie der Geburt.....</b>	<b>5</b>
2.2.1	Physiologie der Geburt .....	5
2.2.2	Pathologie der Geburt.....	6
2.2.2.1	Geburtsstörungen seitens des Muttertiers.....	6
2.2.2.2	Geburtsstörungen seitens der Frucht.....	6
2.2.2.3	Geburtsstörungen seitens der Eihäute .....	6
<b>2.3</b>	<b>Vorzeitige Geburtseinleitung mit Prostaglandin F<sub>2α</sub> .....</b>	<b>6</b>
2.3.1	Die Retentio secundinarum des Rindes unter experimentellen Bedingungen.....	7
<b>2.4</b>	<b>Physiologie und Pathologie des Nachgeburtsstadiums .....</b>	<b>8</b>
2.4.1	Ungestörter Abgang der Secundinae.....	8
2.4.2	Die Retentio secundinarum des Rindes.....	8
2.4.2.1	Vergleichende Betrachtungen bei anderen Tierarten .....	14
<b>2.5</b>	<b>Matrix-Metalloproteinasen und ihre Gewebehinhibitoren.....</b>	<b>14</b>
2.5.1	Allgemeine Betrachtungen .....	14
2.5.2	Ausgewählte Matrix-Metalloproteinasen und Gewebehinhibitoren .....	16
2.5.2.1	Gelatinasen .....	16
2.5.2.1.1	MMP-2.....	16
2.5.2.1.2	MMP-9.....	17
2.5.2.2	TIMP-1 und TIMP-2.....	18
2.5.2.3	Besonderheiten des MMP-2-/TIMP-2-Bindungskomplexes.....	19
2.5.2.4	Besondere Betrachtungen beim Rind.....	19
<b>3</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiergut, Material und Probenherkunft.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Probenentnahme und Probenaufbereitung .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Histologische Präparation.....</b>	<b>23</b>

3.4	Methodik der lichtmikroskopischen Untersuchungen.....	23
3.5	Methodik der enzymhistochemischen Untersuchungen.....	24
3.6	Methodik der immunhistologischen Untersuchungen.....	24
3.7	Methodik der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	26
4	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
4.1	<b>Zusammenhang zwischen den anamnestisch-klinischen Daten der Tiere und dem Auftreten einer Retentio secundinarum .....</b>	<b>28</b>
4.2	<b>Befunde bei Kühen mit termingerechter Spontangeburt und ungestörtem Abgang der Secundinae (Gruppe I; Kontrollgruppe; n=5) .....</b>	<b>28</b>
4.2.1	Lichtmikroskopische Befunde .....	28
4.2.1.1	Placenta materna matura .....	29
4.2.1.2	Placenta fetalis matura .....	30
4.2.2	Enzymhistochemische Befunde .....	32
4.2.3	Immunhistologische Befunde .....	32
4.2.3.1	Placenta materna matura .....	32
4.2.3.2	Placenta fetalis matura .....	34
4.2.4	Zusammenfassung der Befunde der Tiere aus Gruppe I .....	34
4.3	<b>Befunde bei Kühen mit experimentell verkürzter Gestationsdauer, Schnittentbindung und Vorliegen einer Retentio secundinarum (Versuchsgruppe II; n=31) .....</b>	<b>36</b>
4.3.1	Lichtmikroskopische Befunde .....	36
4.3.1.1	<i>Unreife Plazentome</i> .....	36
4.3.1.1.1	Placenta materna immatura .....	36
4.3.1.1.2	Placenta fetalis immatura.....	37
4.3.1.2	<i>Unvollständig ausgereifte Plazentome</i> .....	39
4.3.1.2.1	Placenta materna matura retardata.....	40
4.3.1.2.2	Placenta fetalis matura retardata .....	40
4.3.2	Enzymhistochemische Befunde .....	42
4.3.3	Immunhistologische Befunde .....	43
4.3.3.1	<i>Unreife Plazentome</i> .....	43
4.3.3.1.1	Placenta materna immatura .....	43
4.3.3.1.2	Placenta fetalis immatura.....	44
4.3.3.2	<i>Unvollständig ausgereifte Plazentome</i> .....	46
4.3.3.2.1	Placenta materna matura retardata.....	46

4.3.3.2.2	Placenta fetalis matura retardata .....	47
4.3.4	Zusammenfassung der Befunde der Tiere aus Gruppe II .....	48
<b>4.4</b>	<b>Befunde bei Kühen mit physiologischer Gestationsdauer, klinisch notwendigen Geburtshilfemaßnahmen und Vorliegen einer Retentio secundinarum (Versuchsgruppe III; n=15).....</b>	<b>50</b>
4.4.1	Lichtmikroskopische Befunde .....	50
4.4.1.1	Placenta materna.....	50
4.4.1.2	Placenta fetalis .....	50
4.4.2	Enzymhistochemische Befunde .....	51
4.4.3	Immunhistologische Befunde .....	51
4.4.3.1	Placenta materna.....	51
4.4.3.2	Placenta fetalis .....	52
<b>4.5</b>	<b>Vergleichende ultrastrukturelle Befunde (Gruppe I; n=2 und Gruppe II unreif; n=5).....</b>	<b>52</b>
<b>4.6</b>	<b>Zusammenfassung der Befunde.....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>54</b>
5.1	Ziel der Arbeit .....	54
5.2	Kritische Beurteilung des Untersuchungsgutes und der Untersuchungsmethoden.....	54
5.3	Morphologisch-funktionelle Aspekte zur <i>Placenta matura</i> nach termingerechter Spontangeburt und ungestörtem Puerperium .....	55
5.4	Morphologisch-funktionelle Aspekte zur <i>Placenta immatura</i> nach vorzeitig eingeleiteter Geburt und Sectio caesarea sowie klinisch manifester Retentio secundinarum.....	57
5.5	Besonderheiten der <i>unvollständig ausgereiften Plazentome</i> .....	63
5.6	Betrachtungen zur Manifestation einer Retentio secundinarum nach termingerechter Spontangeburt.....	63
5.7	Abschließende Betrachtung.....	64
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>

<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>I</b>
<b>9.1</b>	<b>Verfahrensschritte der enzymhistochemischen Untersuchungen.....</b>	<b>III</b>
9.1.1	Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase (CIAE).....	III
<b>9.2</b>	<b>Verfahrensschritte der Immunhistologie .....</b>	<b>III</b>
9.2.1	Vorbehandlung .....	III
9.2.2	Besondere Verfahren .....	IV
9.2.3	Antigennachweis mittels monoklonaler Antikörper nach der PAP-Methode .....	IV
9.2.4	Antigennachweis mittels polyklonaler Antikörper nach der PAP-Methode .....	IV
9.2.5	Standard zur Nachbehandlung .....	V
9.2.6	Verwendete Antikörper und Seren.....	V
<b>9.3</b>	<b>Lösungen und Puffer .....</b>	<b>VII</b>
<b>9.4</b>	<b>Bilddokumentation.....</b>	<b>IX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serumalbumin
CIAE	Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase
bzw.	beziehungsweise
diskontin.	diskontinuierlich
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
et al.	et alii
etc.	et cetera
Fa.	Firma
°C	Grad Celsius
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
kDA	kiloDalton
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mat.	maternal
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
nm	Nanometer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase Methode
PGE	Prostaglandin E
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
S.	Seite
s.	siehe
SI-Wert	Staining Intensity
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TiHo	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover



## 1 EINLEITUNG

Nach wie vor stellt die Retentio secundinarum des Rindes eine, vor allem in ihren wirtschaftlichen Auswirkungen, sehr bedeutsame Puerperalerkrankung dar. Gerade in der intensiven Nutztierhaltung ist ein ungestörter, komplikationsloser Nachgeburtsabgang wichtige Grundlage für den effizienten züchterischen Einsatz der Tiere.



Trotz des medizinischen Fortschritts und der intensiven wissenschaftlichen Forschung der letzten Jahrzehnte konnte die Ursache der Nachgeburtsverhaltung nicht vollständig aufgeklärt werden, und so gilt diese Erkrankung nach wie vor, wie von GRUNERT (1983) treffend umschrieben, nicht als Krankheit per se, sondern als klinisches Symptom verschiedener Grunderkrankungen. Auch aktuelle Studien erheben lediglich den Anspruch, Teilbeiträge zur Erforschung der Ätiopathogenese dieser Erkrankung leisten zu können.

**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung einer bovinen Plazenta nach Leonardo Da Vinci (BEDINI 2005)

Eine Grundvoraussetzung für den ungestörten Abgang der Secundinae stellt die morphologische Reife der plazentaren Strukturen (Abb. 1.1) zum Zeitpunkt des Partus dar.

Ausgehend von diesem Gesichtspunkt, sollen in der vorliegenden Arbeit spezielle Aspekte der „morphologischen und funktionellen Ausreifung“ der bovinen Plazenta nach definierter Gestationsdauer von Tieren mit unterschiedlichem Geburtsverlauf mittels lichtmikroskopischer Methoden (konventionelle Histologie, Enzymhistochemie und Immunhistologie) sowie exemplarischer elektronenmikroskopischer Untersuchungen beleuchtet werden. Der Schwerpunkt lag hierbei auf dem immunhistologischen Nachweis spezieller Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2) und ihrer Gewebeinhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2).

Neben einer Kontrollgruppe aus Tieren mit komplikationsloser Spontangeburt und ungestörtem Puerperium sowie einer Versuchsgruppe mit experimentell provozierte Nachgeburtsverhaltung wurden klinische Fälle einer Retentio secundinarum nach physiologischer Trächtigkeitsdauer mit in die Untersuchungen einbezogen, um möglichen geweblichen und/oder funktionellen Wechselbeziehungen zwischen Physiologie, Versuchsmodell und Klinik nachgehen zu können.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Der Aufbau des bovinen Uterus**

#### **2.1.1 Nicht gravider Uterus**

Die Uteruswand des Rindes gliedert sich in die drei Schichten Endo-, Myo- und Perimetrium. Das Endometrium (Tunica mucosa) ist luminal von einem zum Teil mehrreihigen, hochprismatischen Oberflächenepithel mit apikalem Mikrovillisaum ausgekleidet (Epithelium simplex). Darunter befindet sich ein spinozelluläres Bindegewebe, welches die Uterindrüsen enthält, die Lamina propria mucosae (LIEBICH 2004). Bereits im fetalen Uterus sind in diesem Bereich die Karunkelanlagen makroskopisch sichtbar (ATKINSON et al. 1984).

Im zyklischen Uterus des Rindes ist in diesen Karunkelanlagen vorwiegend Kollagen Typ-III nachweisbar, Kollagen Typ-I ist lediglich in Form eines feinen Maschenwerkes im subepithelialen Endometrium zu erkennen (BOOS 2000). Auch in den Karunkeln trächtiger Rinder lässt sich eine vergleichbare Kollagenfaserverteilung darstellen (STELLJES 1998).

Das Myometrium (Tunica muscularis) weist innere zirkulär sowie äußere longitudinal angeordnete glatte Muskelfaserbündel auf, welche die Kontraktilität des Organs gewährleisten. Die äußere Schicht, bestehend aus einem einschichtigen Mesothel, stellt das Perimetrium (Tunica serosa) dar und ist von der bindegewebigen Tela subserosa unterlagert (LIEBICH 2004).

Zur lokalen Hormonrezeptorverteilung/-expressionsmuster im nicht graviden bovinen Uterus ist in der verfügbaren Literatur wenig bekannt: BOOS et al. (1996) weisen mittels immunhistologischer Methoden im zyklischen Uterus des Rindes im Stroma sowie im glandulären Epithel kontinuierlich Östrogenrezeptoren, im Drüsenepithel vereinzelt unregelmäßig sowie im periglandulären Bindegewebe, vom fünften zum 15. Zyklustag abfallend, Progesteronrezeptoren nach.

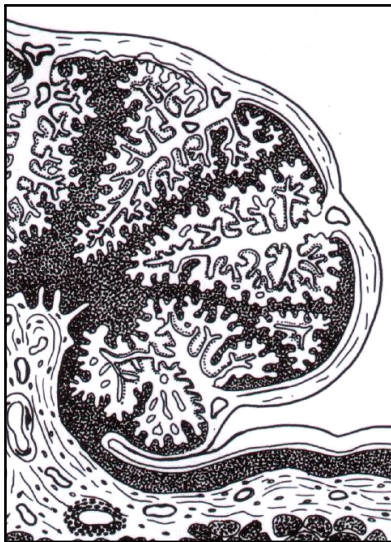
#### **2.1.2 Gravider Uterus (Plazenta)**

Der gravide Uterus des Rindes verfügt etwa ab dem 30. Trächtigkeitstag über annähernd 100 makroskopisch differenzierbare Karunkeln, die in jeweils zwei mesometrialen und zwei antimesometrialen Reihen im Korpus und über beide Uterushörner gleichmäßig verteilt sind (ATKINSON et al. 1984, SCHLAFER et al. 2000). Auch LAVEN u. PETERS (2001) können keine signifikanten Variationen in der Plazentomanzahl insgesamt erkennen, sie stellen aber im nicht tragenden Horn, verglichen mit dem tragenden, weniger, kleinere und dünnere Plazentome fest.



Die Karunkeln weisen mit einreihigem, isoprismatischem Epithel ausgekleidete, auf einem bindegewebigen Grundstock der Tunica propria sitzende Krypten auf (SOBIRAJ 1992).

Das Kryptenepithel sitzt auf einer bereits ab der vierten Trächtigkeitswoche kontinuierlichen und breiten Basallamina auf (MACINTYRE et al. 2002). Die Kontaktaufnahme der Placenta fetalis mit dem Kryptenepithel erfolgt über die so genannten Kotyledonen, welche sich über ebenfalls mit isoprismatischem Epithel ausgekleidete Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten in die Krypten der kor-



respondierenden Karunkeln fingerförmig einstülpen (SCHOON 1989, SCHLAFER et al. 2000). Auf diese Weise entsteht das von STRAHL (1911) beschriebene Bild einer Semiplacenta multiplex seu cotyledonaria, bzw., entsprechend der feto-maternalen Kontaktzone, eine Placenta epitheliochorialis (GROSSER 1909). LEISER u. KAUFMANN (1994) bezeichnen diese Verzweigung zwischen maternaler und fetaler Plazenta als einen villösen Plazentationstyp.

**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des Ineinandergreifens von Placenta fetalis et materna im Plazentom des Rindes nach SCHNORR (1996)

Bis zum Zeitpunkt der Geburt erreichen die Plazentome im tragenden Horn eine ovoide bis längsovale Form mit einer Länge von zehn bis zwölf sowie einer Dicke von zwei bis drei Zentimetern (SCHLAFER et al. 2000) und sind an der Plazentombasis deutlich gestielt vom interkarunkulären Endometrium abgesetzt (SOBIRAJ 1992). Die kollagenfaserreichen Bindegewebssepten der Karunkeln (STELLJES 1998, BOOS 2000) sind von zahlreichen Kapillaren durchzogen, die eine, auf einer Basallamina aufsitzende, kontinuierliche Endothelauskleidung besitzen (SCHOON 1989).

Zum Trächtigkeitsende erfährt die Plazenta eine kontinuierliche Maturation (SCHOON 1989): Von der Frühträchtigkeit bis etwa zum 240. Gestationstag liegen die maternalen, andeutungsweise trapezförmigen Kryptenepithelien, einer kontinuierlichen Basallamina aufsitzend, den größeren Chorionepithelzellen gegenüber. Der epitheliochoriale Kontakt wird über einen dichten, interdigitierenden Mikrovillisaum gewährleistet. Zum Geburtstermin erfolgt kontinuierlich eine numerische Reduktion sowie eine Abflachung der Kryptenepithelzellen (SCHULZ u. MERKT 1956, WOICKE et al. 1986, WILLMS 1986, SCHOON 1989, TOLHUYSEN 1990, SOBIRAJ 1992).

Ausgehend vom fetalen Teil der Plazenta, kommen etwa ab dem 20. Gestationstag (WOODING 1983) neben den mononukleären Epithelzellen auch solche mit zwei (Diplokaryozyten) und seltener mit drei Kernen vor (BJÖRKMAN 1968, KLISCH et al. 1999). WOODING u. BECKERS (1987)

unterstützen die These, dass sich trinukleäre Riesenzellen im Bereich der feto-maternalen Kontaktzone durch Fusion (Synzytienbildung) aus Diplokaryozyten und Kryptenepithelzellen formieren. KLISCH et al. (1999) hingegen sehen zumindest bei einem geringen Anteil dieser Zellen deren Entstehung in einer tripolaren, azytokinetischen Mitose begründet.

An diesen so genannten „Trophoblast-Riesenzellen“ ist im Rahmen ihres gerichteten Migrationverhaltens von der fetalen Basalmembran hin zum maternalen Kryptenepithel ultrastrukturell ein Reifungsprozess zu erkennen (WOODING u. WATHES 1980, SCHOON 1989). Innerhalb des placentaren Stoffwechsels werden ihnen beispielsweise die Produktion von Progesteron (MYERS u. REIMERS 1988, ULLMANN u. REIMERS 1989), Östrogen/Östradiol (MATAMOROS et al. 1994), bovinem placentaren Laktogen (DUELLO et al. 1986, MILOSAVLJEVIC et al. 1989, NAKANO et al. 2001) oder auch Prolaktin-related-protein (YAMADA et al. 2002) zugeschrieben. Im Bereich der Granula im Zytoplasma der Diplokaryozyten ist ein Trächtigkeits-assoziiertes Glykoprotein (ZOLI et al. 1992), bzw. ein Gastrin-releasing-peptid nachweisbar (BUDIPITOJO et al. 2001). Funktion, embryologische Herkunft und exakter Wirkungsmechanismus der mehrkernigen Zellen ist innerhalb der verfügbaren Literatur bislang ungeklärt.

Machen diese Zellen während der Trächtigkeit etwa ein Fünftel der epithelialen Zellen aus, so sind sie unmittelbar post partum nach ungestörtem Abgang der Secundinae nur noch sehr vereinzelt oder gar nicht mehr nachweisbar (SCHOON 1989, TOLHUYSEN 1990, GROSS et al. 1991, SOBIRAJ 1992). Da diese fetalen binukleären Zellen bei ihrem Migrationsprozess direkten Kontakt zur maternalen Basalmembran aufnehmen und zur termingerechten Geburt eine nahezu vollständige Desintegration der Kryptenepithelzellen stattgefunden hat (HOLM et al. 1964), liegt zu diesem Zeitpunkt das Bild einer Placenta syndesmochorialis vor (SCHOON 1989).

Das Stroma unterliegt nach den Arbeiten von KAIDI et al. (1995) keinen Veränderungen bezüglich des Kollagenfasergehaltes, und auch STELLJES (1998) registriert im Verlauf der Trächtigkeit keine wesentlichen Abweichungen in der Zusammensetzung der Kollagenfasern.

Etwa ab dem 150. Trächtigkeitstag sind Östrogenrezeptoren im maternalen Stroma, auch perikapillär und im Karunkelepithel nachweisbar, im fetalen Kompartiment kommen sie nicht vor (SCHULER et al. 2002). Progesteronrezeptoren sind nach diesen Autoren (SCHULER et al. 1999) ausschließlich im maternalen Stroma lokalisiert mit einem deutlichen Anstieg vom 150. zum 270. Trächtigkeitstag hin. Das zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit notwendige Progesteron wird von Gestationsbeginn bis etwa zum 190. Gestationstag vorwiegend von den Ovarien bereitgestellt (HOFFMANN 1994),

etwa ab dem 100. bis 120. Tag der Trächtigkeit beginnt die Plazenta mit der primären extraovariellen Progesteronproduktion (SHEMESH 1990, HOFFMANN 1994).

## **2.2 Physiologie und Pathologie der Geburt**

### **2.2.1 Physiologie der Geburt**

Phasensynchron zur plazentaren Ausreifung erfolgt im präpartalen Zeitraum ein Abfall des die Trächtigkeit erhaltenden Progesteronplateaus sowie ein die Geburt vorbereitender Östradiolanstieg sowohl im peripheren Blutplasma (WISCHRAL et al. 2001, TAKAGI et al. 2002) als auch im plazentaren Gewebe (TSUMAGARI et al. 1993, TAKAGI et al. 2002). Parallel zu diesem Anstieg des Plasma-Östrogenspiegels ist nach den Untersuchungen von SCHOON u. SCHOON (1991) eine kontinuierliche Zunahme des immunreaktiven Score von Östrogenrezeptoren im maternalen Stroma nachweisbar.

In Abhängigkeit von diesen hormonellen Verschiebungen zeigen sich klinisch sichtbare Geburtsvorbereitungen wie das Erschlaffen der Beckenbänder oder die Ödematisierung von Vulva und Euter (BIRGEL et al. 1996). Durch die unter dem Einfluss von Oxytozin und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stehende Wehentätigkeit des Myometriums erfolgt die Austreibung der Frucht (HOFFMANN 1994). Innerhalb der Nachgeburtsphase ist der vollständige Abgang der Secundinae spätestens zwölf Stunden post partum abgeschlossen (SCHULZ u. MERKT 1956, HEUWIESER et al. 1986a).

In einem zusammenfassenden Überblick über den peripartalen endokrinologischen Status des Rindes beschreiben KINDAHL et al. (2004) einen zweiphasigen Serum-Progesteronabfall in den letzten vier Trächtigkeitswochen, mit einem in der Folge basalen Progesteronniveau bis zur ersten postpartalen Ovulation. Zum Partus hin finden sich kontinuierlich ansteigende Serumwerte für Kortisol- und Prostaglandinmetaboliten, bzw. rapide zunehmende Serum-Östrogenlevel in der Endphase der Gravidität.

Histologisch kann zum Zeitpunkt der Geburt innerhalb der Karunkeln eine hohe Anzahl freier Zellen vorwiegend in Form neutrophiler Granulozyten (SOBIRAJ 1992), bzw. eine deutlich ansteigende chemotaktische Aktivität der Leukozyten (GUNNINK 1984b, HEUWIESER et al. 1986b) und im Bereich der Krypten verbliebener Zelldetritus des Allantochorions nachgewiesen werden (SCHOON 1989, SOBIRAJ 1992).

## **2.2.2 Pathologie der Geburt**

### **2.2.2.1 Geburtsstörungen seitens des Muttertiers**

Allgemeinerkrankungen des Muttertieres, meist infolge Haltungs- und Fütterungsfehlern, die vor allem zu Stoffwechselbelastungen führen, stören gelegentlich, aber doch häufiger als spezielle Organkrankheiten, den normalen Geburtsablauf. Wichtige organspezifische Alterationen, die den Partus beeinflussen können, sind beim Rind Rupturen der Bauchdecke oder des Darmes sowie massiver Aszites. Des Weiteren stehen primäre und sekundäre Wehenschwächen, übermäßige Wehen, Einengungen des harten und weichen Geburtskanals, Verlagerungen und Rupturen des Uterus, neoplastische, traumatische und entzündliche Veränderungen sowie Missbildungen im Bereich des Uterus im Vordergrund (BERCHTHOLD u. RÜSCH 1993b).

### **2.2.2.2 Geburtsstörungen seitens der Frucht**

Die Geburtsstörungen von Seiten der Frucht gehen von Größe-, Haltungs-, Stellungs- und Lageanomalien der Frucht, abgestorbenen Früchten, Missbildungen und Mehrlingsgeburten aus. Hierbei werden beim Rind am häufigsten relativ und absolut zu große Früchte, Rückenkopfhaltung sowie Halsdrehungen um die Längsachse, Tarsal- und Hüftbeugung, seitliche Stellung und/oder Bauchvertikallage der Frucht, emphysematöse Früchte, Gliedmaßenverkrümmungen oder auch ein Schistosoma reflexum beobachtet (GRUNERT 1993a).

### **2.2.2.3 Geburtsstörungen seitens der Eihäute**

Im Unterschied zum Menschen, spielen beim Tier Veränderungen im Bereich der Eihäute im Zusammenhang mit Geburtskomplikationen eine untergeordnete Rolle. Speziell beim Rind ist die sog. Eihautwassersucht, meist infolge einer Kompression von Eihaut oder Nabelstrang, von Bedeutung. Außerdem können placentare Anomalien, zum Beispiel hypertrophe Plazentome, so genannte „Riesenplazentome“, eine Placenta diffusa completa, anstelle einer Semiplacenta cotyledonaria, ähnlich der des Pferdes, oder auch eine Placenta accessoria im Bereich des zottenfreien Chorions sub partu zu schweren bis unstillbaren Blutungen führen (BERCHTHOLD u. RÜSCH 1993a).

## **2.3 Vorzeitige Geburtseinleitung mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$**

Eine medikamentelle Geburtseinleitung beim Rind mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), etwa ein bis zwei Wochen vor dem erwarteten Geburtstermin, wird von mehreren Autoren beschrieben: Bei KORN-

MATITSUK et al. (2000) erfolgen 60 bis 120 Stunden post injectionem ausnahmslos Spontangeburt mit klinischen Geburtsanzeichen wie Relaxation der Beckenbänder, reduzierte Körpertemperatur, Absinken des Progesteron- und Anstieg des Östradiolspiegels. Alle untersuchten Tiere entwickeln jedoch eine Retentio secundinarum. KASK et al. (2000) leiten bei fünf Kühen durch zweifache  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektion eine um 14 Tage vorgezogene Geburt ein, wobei vier der Tiere 24 Stunden nach dem Partus eine vollständige Retention der Plazenta aufweisen. Für zwei Studien bezüglich der postpartalen antibiotischen und antinflammatorischen Behandlung von Endometritiden beim Rind nutzen KÖNIGSSON u. Mitarbeiter (2001, 2002) die vorzeitige Geburtseinleitung mittels zweimaliger Prostaglandin-Applikation ab dem 260. Trächtigkeitstag zur erfolgreichen experimentellen Provokation einer Nachgeburtsverhaltung bei allen eingesetzten Tieren. Auch KINDAHL et al. (2002) erreichen durch zweifache  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektionen in einem Intervall von 24 Stunden am 268. bzw. 269. Tag der Gestation vorzeitige Geburten, die entweder spontan oder mittels konservativer Geburtshilfe realisiert werden können.

Neben  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hat auch der Einsatz von Mifepriston (RU 486), einem Antigestagen (DLAMINI et al. 1995), bzw. der Glukokortikoide Dexamethason (MUSAH et al. 1987, SCHOON 1989), bzw. Flumethason (WOICKE et al. 1986) zur Geburtseinleitung beim Rind Verwendung gefunden.

$\text{PGF}_{2\alpha}$ -Injektionen zwei Stunden post partum haben nach den Untersuchungen von STEVENS u. DINSMORE (1997) keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Vorkommens einer Retentio secundinarum.

### **2.3.1 Die Retentio secundinarum des Rindes unter experimentellen Bedingungen**

Für eine möglichst praxisrelevante Erforschung der Nachgeburtsverhaltung wird bis heute eine mittels  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vorzeitig eingeleitete Geburt als Versuchsmodell für eine provozierte Retention der Secundinae durchgeführt (MUSAH et al. 1987, RASMUSSEN et al. 1996, LAVEN u. PETERS 1996, STEVENS u. DINSMORE 1997, KONIGSSON et al. 2001, BREEVELD-DWARKASING et al. 2003, BOOS et al. 2003a).

Mittels dieser Methode ergibt sich die Möglichkeit, eine präzise anamnestisch-klinisch definierbare, experimentell erkrankte Versuchsgruppe zu erstellen, die beispielsweise für Untersuchungen zur elektromyographischen Aktivität des Myometriums (BREEVELD-DWARKASING et al. 2003) oder Antibiotika-Wirkungen auf postpartale Endometritiden (KONIGSSON et al. 2001) dient.

## **2.4 Physiologie und Pathologie des Nachgeburtsstadiums**

### **2.4.1 Ungestörter Abgang der Secundinae**

Der physiologische Abgang der Nachgeburt beim Rind bis zwölf Stunden post partum erfordert die Trennung von Kotyledone und Karunkel innerhalb eines Plazentoms. Voraussetzung hierfür ist zum einen die bereits erwähnte morphologisch-funktionelle Ausreifung der plazentaren Strukturen (SCHOON 1989) sowie die mechanische Lockerung infolge der Uteruskontraktionen in den Nachgeburtswehen (SCHULZ u. MERKT 1956). Hierbei kommt es zu einer Abflachung und seitlichen Ausdehnung der Plazentome sowie zu einer alternierenden Ischämie und Hyperämie der Zotten (GRUNERT 1985). Das Reißen der Nabelschnur und das damit verbundene Ausbluten der Plazenta fetalis mit Kollabieren der Choriongefäße und Ischämie der Zotten führt zu einer Verringerung der Zottenoberfläche und erleichtert die Ablösung der Chorionzotten aus den Karunkelkrypten (GRUNERT 1985).

Während SCHULZ u. MERKT (1956) sowie SCHULZ u. GRUNERT (1959) noch eine Kollagenisierung des plazentaren Bindegewebes im Sinne eines „senilen Organs“ als Geburtsvorbereitung für eine komplikationslose Ablösung der Nachgeburt bereits in den letzten Trächtigkeitsmonaten ansehen, beschreiben spätere Autoren eine Ödematisierung und hyaline Verquellung des Stromas als Folge der hormonellen Umstellungen im geburtsnahen Zeitraum (GRUNERT 1983, SCHOON 1989).

### **2.4.2 Die Retentio secundinarum des Rindes**

Erfolgt der vollständige Abgang der Nachgeburt beim Rind nicht innerhalb von zwölf Stunden post partum, liegt eine Retentio secundinarum vor, welche nicht als Krankheit per se, sondern als klinisches Symptom verschiedener Grunderkrankungen angesehen werden muss (SCHULZ u. MERKT 1956, GRUNERT 1983, GRUNERT 1985, SCHOON 1989, GRUNERT 1993c, SCHLAFFER et al. 2000, WIESNER 2003).

Eine tabellarische Literaturübersicht (Auswahl) über das polyfaktorielle Erkrankungsgeschehen der Retentio secundinarum findet sich in Tab. 2.1, Seite 9.

GRUNERT (1983) führt weiterhin aus, dass bei einer Trächtigkeitsdauer von weniger als 271 Tagen oder mehr als 290 Tagen ein deutlich höherer prozentualer Anteil an Nachgeburtsverhaltungen auftritt. Ein Abort vor dem 120. Trächtigkeitstag dagegen verläuft ohne Störungen des Nachgeburtsabgangs. Unabhängig von der Gestationsdauer beschreibt der Autor einen signifikant höheren Anteil an Tieren mit Retentio secundinarum bei Vorliegen einer Azetonämie oder einer Pyogenes-Mastitis im

peripartalen Zeitraum, wohingegen eine Hypokalzämie in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt.

**Tab. 2.1:** Literaturübersicht (Auswahl) über das polyfaktorielle Erkrankungsgeschehen der Retentio secundinarum des Rindes

<b>Faktoren und deren Beteiligung an der Manifestation der Retentio secundinarum</b>			
<b>infektiöse Faktoren</b>		<b>beteiligt</b>	<b>nicht beteiligt</b>
<b>Septikämie</b> (Brucellose)		3	
<b>Plazentitis</b> (bakteriell)		2, 3, 7	
<b>Mastitis</b> (bakteriell)		1, 8	
<b>nicht infektiöse Faktoren</b>		<b>beteiligt</b>	<b>nicht beteiligt</b>
<b>Gestationsdauer</b>	verkürzt	1	
	verlängert	1, 3	
<b>Plazentare Umbauprozesse</b>	Kollagenfasern	3	4, 5, 6
	Diplokaryozyten	21, 36	
<b>Immunologie</b>	Chemotaxis	9, 10, 11	
	Entzündungszellen	12, 13, 14, 16	
	Immunstatus	8, 15	
<b>Endokrinologie</b>	Serum-Hormonspiegel	3, 16, 17, 18	19
	plazentare Hormone	19, 20, 21	
<b>rheologische Phänomene</b>	Gerinnungsstatus	22, 23	
<b>Vitaminstoffwechsel</b>	Vitamin A		26
	β-Karotin	25	
	Vitamin E/Selen	26, 27	
<b>Enzymstoffwechsel</b>	antioxidative Enzyme	32, 33, 34, 35	
<b>Leistungsförderer</b>	Monensin	31	30
<b>sonstige Stoffwechselstörungen</b>		1, 3, 24, 29	28

Legende zu Tab. 2.1:

- |                             |                              |                            |
|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 1 GRUNERT (1983)            | 2 SCHULZ u. MERKT (1956)     | 3 SCHULZ u. GRUNERT (1959) |
| 4 SHARPE et al. (1990)      | 5 SARGES et al. (1998)       | 6 BOOS et al. (2003b)      |
| 7 AL-SADI et al. (1994)     | 8 ZDUNCZYK et al. (1992)     | 9 GUNNINK (1984b)          |
| 10 HEUWIESER et al. (1986b) | 11 DOSOGNE et al. (1999)     | 12 CHASSAGNE et al. (1998) |
| 13 KIMURA et al. (2002)     | 14 MIYOSHI et al. (2002)     | 15 ISHIKAWA et al. (2004)  |
| 16 WESSENDORF et al. (1998) | 17 FURSTENBERG et al. (1990) | 18 WISCHRAL et al. (2001)  |
| 19 TAKAGI et al. (2002)     | 20 KANKOFER et al. (2002)    | 21 GROSS et al. (1987)     |
| 22 SCHOON (1989)            | 23 HEUWIESER et al. (1990a)  | 24 LOTTHAMMER (1983)       |
| 25 MICHAL et al. (1994)     | 26 LEBLANC et al. (2004)     | 27 WIESNER (2003)          |
| 28 KEMP et al. (1998)       | 29 YAMAMOTO et al. (2001)    | 30 BECKETT et al. (1998)   |
| 31 DUFFIELD et al. (2002)   | 32 KANKOFER (2001a)          | 33 KANKOFER (2002)         |
| 34 KANKOFER u. GUZ (2003)   | 35 KANKOFER et al. (2004)    | 36 WILLIAMS et al. (1987)  |

Das Auftreten einer Nachgeburtsverhaltung führen SCHULZ u. MERKT (1956) zum einen auf eine Plazentitis oder ein nicht infektiöses Zottenödem im peripartalen Zeitraum und zum anderen auf eine

bereits intra partum fortgeschrittene Involution oder eine mangelhafte Vorbereitung des plazentaren Gewebes zurück. Als entzündliche Ursache einer Retention der Fruchthüllen wird vor allem eine Brucellen- oder Streptokokkeninfektion angeführt (SCHULZ u. GRUNERT 1959). Beim Vorliegen eines nicht entzündlichen Zottenödems nach gestörtem Abgang der Secundinae weisen diese Autoren auf das Fehlen von stromalen Hyalinisierungsprozessen 24 Stunden post partum hin, welche bei spontaner Ablösung bereits wenige Stunden nach der Geburt zu beobachten sind. Sie beschreiben weiterhin eine große Anzahl verschleppter/übertragener Geburten (ab 290 Trächtigkeitstagen), einhergehend mit intrauterinem Fruchttod, die eine Retention der Eihäute zur Folge haben. In einer morphometrischen Analyse des Gesamtkollagens in Plazentomen verschiedener Gestationsstadien können SHARPE et al. (1990) ab dem 270. Gestationstag bei Kühen mit und ohne Nachgeburtsverhaltung weder im fetalen noch im maternalen Kompartiment beider Tiergruppen Hinweise auf die Ursache der Erkrankung feststellen. Eine Differenzierung des Gesamtkollagens in Typ-I und Typ-III bei vergleichbaren experimentellen Bedingungen erbringt den Nachweis eines erhöhten Anteils an Kollagen Typ-III innerhalb der Kotyledonen bei Vorliegen einer Retentio secundinarum (SHARPE et al. 1990). Der immunhistologische Nachweis von Kollagen Typ-I, -III, -IV und -V in Plazentomen von Kühen mit und ohne Nachgeburtsverhaltung lässt keine ätiopathogenetischen Rückschlüsse auf die Ursache der Erkrankung zu (SARGES et al. 1998). Auch BOOS et al. (2003b) können für die Kollagene Typ-I, -III und -IV zwar typ- und ortsspezifische Verteilungsmuster im Uterus trächtiger Rinder, aber keine Unterschiede zwischen Tieren mit und ohne Retentio secundinarum aufzeigen.

Das Vorliegen einer Plazentitis als wird begünstigender Faktor für das Auftreten einer Retentio secundinarum dargelegt (WILLIAMS et al. 1987, AL-SADI et al. 1994). DOHMEN et al. (2000) belegen durch mikrobiologische Untersuchungen von Uterusspülproben beim Rind, dass es bei Vorliegen einer Retentio secundinarum und gleichzeitiger *E. coli*-Besiedlung zu einer Begünstigung für Uterusinfektionen mit *Arcanobacterium pyogenes* bzw. gram-negativen Anaerobiern kommt.

ZDUNCZYK et al. (1992) sehen eine signifikant höhere Häufigkeit für das Auftreten einer Retentio secundinarum bei gleichzeitigem Vorliegen einer klinisch manifesten Mastitis und führen dies auf eine verminderte Aktivität des Abwehrsystems zurück. Der verminderten Abwehrleistung im Sinne einer anhaltend reduzierten chemotaktischen Aktivität neutrophiler Granulozyten ab dem Zeitpunkt der Geburt wird von mehreren Autoren (GUNNINK 1984a, GUNNINK 1984b, HEUWIESER et al. 1986b, GILBERT et al. 1993, CAI et al. 1994, DOSOGNE et al. 1999) als eine wichtige Beteiligung an der Retentio secundinarum angesehen.



Bei der Einschätzung von Risikofaktoren für eine Nachgeburtsverhaltung anhand von vergleichenden Blutanalysen bei Kühen mit ungestörtem Abgang und Retention der Nachgeburt finden CHASSAGNE et al. (1998) lediglich erhöhte Erythrozyten- und erniedrigte Monozytenzahlen als disponierende Faktoren. Einen Einfluss etwa des Blut-Glukosespiegels können die Autoren nicht nachweisen.

Der Nachweis von reduziertem Interleukin-8, einem Aktivierungsfaktor für neutrophile Granulozyten, in fetalem Plazentagewebe wird als eine mögliche Ursache für die verminderte Neutrophilie bei bestehender Retentio secundinarum gedeutet (KIMURA et al. 2002). Ebenso wird der reduzierten Phagozytoseaktivität von Makrophagen in Plazentomen von Kühen mit verzögertem Plazentaabgang im Sinne einer Abwehrschwäche eine Beteiligung an dieser Erkrankung zugesprochen (MIYOSHI et al. 2002).

ISHIKAWA et al. (2004) sehen bei Kühen mit Retention der Secundinae in der verringerten Konzentration des Zytokins Interleukin-6 im Blut einen Zusammenhang zwischen dem nachteilig verschobenen immunologischen Status der Patienten und der Manifestation einer Retentio secundinarum. Aus der erhöhten Leukozytenzahl, speziell neutrophiler Granulozyten, in Verbindung mit einem hohen Serum-Östrogenspiegel zum Zeitpunkt des Partus schließen auch WESSENDORF et al. (1998) unter anderem auf eine hormonelle Stimulation des Immunsystems beim Rind sub partu, die bei der Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung, repräsentiert durch die fehlende Infiltration neutrophiler Granulozyten, ausgeblieben ist.

Binukleäre Zellen (Diplokaryozyten), eine weitere Teilpopulation „freier Zellen“ der bovinen Plazenta, gehen bis zum Zeitpunkt der Geburt bei ungestörter Ablösung der Secundinae in ihrer Anzahl deutlich zurück. Im Rahmen einer Nachgeburtsverhaltung bleiben sie jedoch in annähernd unveränderter Menge nachweisbar (WILLIAMS et al. 1987, GROSS et al. 1987). Die Klärung ihrer genauen Funktion bedarf, wie oben bereits erwähnt, weiterer Untersuchungen.

In Bezug auf die plazentare Ausreifung und die damit verbundenen Lösungsprozesse der Placenta fetalis wird beim Rind dem Hormonstatus eine hohe Bedeutung zugesprochen (SCHULZ u. GRUNERT 1959), jedoch liegen über Plasma-Hormonwerte in Verbindung mit dem Auftreten von Nachgeburtsverhaltungen recht unterschiedliche Aussagen vor: einerseits ein erniedrigter Plasma-Östrogenspiegel bei Retentio-Patientinnen (GRUNERT et al. 1989, FURSTENBERG et al. 1990, WISCHRAL et al. 2001), andererseits keine Veränderungen des Östrogen- und auch des Progesteronniveaus zwischen Tieren mit verzögertem und spontanem Plazentaabgang (INABA et al. 1986, TAKAGI et al. 2002). Dem gegenüber weisen FURSTENBERG u. Mitarbeiter (1990) eine ernied-

rigte Progesteronkonzentration im Plasma von Kühen mit Nachgeburtsverhaltung nach. Der Prostaglandinmetabolit PGE wird anhand von Untersuchungen zur Prostaglandin E<sub>2</sub> 9-keto Reduktase-Aktivität (KANKOFER et al. 2002) sowie durch PGE-de-novo-Synthese-Untersuchungen (GROSS et al. 1987) in bovinem Plazentagewebe in Verbindung mit Nachgeburtsverhaltungen angesprochen und als erhöht nachgewiesen.

Erhöhte Kortisol- und PGF<sub>2α</sub>-Serumwerte (PETER u. BOSU 1987, WISCHRAL et al. 2001) werden bei Vorliegen eines verzögerten Nachgeburtsabgangs ebenso beschrieben wie niedrigere Oxytozin- und Oxytozinrezeptor-Konzentrationen (TAKAGI et al. 2002), verglichen mit Tieren ohne gestörtes Puerperium.

SCHOON (1989) weist bei Kühen mit Nachgeburtsverhaltung drei Stunden post partum einen Abfall der lokalen plazentaren fibrinolytischen Aktivität nach und wertet dies als eine Abweichung vom lokalen physiologischen Gerinnungsstatus bei ungestörtem Nachgeburtsabgang. In diesem Zusammenhang zeigt die Erstellung von „Gerinnungsprofilen“ (Prothrombin-, partielle Thromboplastin- und Thrombin-Zeit, Fibrinogenkonzentration, Thrombozytenzahl), von klinisch gesunden Rindern ante und post partum im Vergleich zu nicht trächtigen Tieren eine statistisch signifikante Hyperkoagulabilität (Gerinnungsdisposition) 72 Stunden vor bis 48 Stunden nach der Geburt (HEUWIESER et al. 1990a). Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen zeigen Retentio secundinarum-Patientinnen gegenüber Tieren mit ungestörter Plazentaablösung eine statistisch signifikant erhöhte Fibrinogenkonzentration zum Zeitpunkt der Geburt bis neun Tage post partum (HEUWIESER et al. 1990b).

LOTTHAMMER (1983) weist im Zusammenhang mit einer Nachgeburtsverhaltung bereits sechs bis acht Wochen vor dem Partus bestehende, endokrin bedingte Stoffwechsellabilitäten (erhöhte Harnstoff- und Bilirubingehalte im Blutplasma) nach, die eine Stoffwechselbelastung darstellen und in deren Folge die physiologische Plazentaausreifung und somit die Ablösung der Secundinae gestört ist.

Im Rahmen von Fütterungsversuchen bei hochträchtigen Rindern ist ein vermehrtes Auftreten von Nachgeburtsverhaltungen bei Tieren mit Fütterungsrationen ohne β-Carotin-Supplementierung feststellbar (MICHAL et al. 1994). Die Autoren sehen in der erhöhten alimentären Bereitstellung von β-Carotin eine Stimulation der zellvermittelten Abwehr, welche die Häufigkeit von Erkrankungen des Reproduktionstrakts reduziert.

Eine parenterale Retinolapplikation beim Rind im geburtsnahen Zeitraum korreliert nach den Untersuchungen von LEBLANC et al. (2004) lediglich mit einem verringerten Auftreten von Mastitiden,

nicht aber von Nachgeburtsverhaltungen. In zwei weiteren Studien belegen diese Autoren einen, wenn auch nicht signifikanten positiven Einfluss einer erhöhten Tokopherolkonzentration im Blut auf die Inzidenz von Nachgeburtsverhaltungen (LEBLANC et al. 2004), insbesondere wenn die Tiere vor der Vitamingabe lediglich einen marginalen Vitamin-E-Spiegel im Serum aufweisen (LEBLANC et al. 2002).

Bei Tieren mit Retentio secundinarum in bestimmten Selen-Mangelgebieten ist eine geringere Konzentration des Plasma-Selenspiegels und des Selengehaltes in maternalem, nicht aber im fetalen Plazentagewebe darstellbar (WIESNER 2003).

Ergebnisse aus Fütterungsuntersuchungen (KEMP et al. 1998) zum Einfluss des Linolensäuregehaltes im Futter auf den Plasma-Prostaglandinlevel sowie das Auftreten von Nachgeburtsverhaltungen erbringen keine deutlichen Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Dagegen besteht nach YAMAMOTO et al. (2001) ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Abfall des Serum-Apolipoproteins C-III, einem Protein der high-density Lipoproteinfraktion, und der Manifestation peripartaler Erkrankungen wie der Retentio secundinarum, Labmagenverlagerungen oder auch Ketosen.

Während BECKETT et al. (1998) keinen Zusammenhang zwischen der Gabe des Leistungsförderers Monensin im Bolus 40 Tage ante partum und der Retention der Secundinae nachweisen können, sehen DUFFIELD et al. (2002) eine Abnahme der Inzidenz von Nachgeburtsverhaltungen nach erfolgter Gabe dieses Futterzusatzes zwei bis vier Wochen vor dem Partus.

In aktuellen Untersuchungen befasst sich KANKOFER (2001a) mit dem Einfluss „oxidativen Stresses“ auf das Vorkommen einer Retentio secundinarum: Die Aktivität der antioxidativen Enzyme Glutathionperoxidase (GSH), Katalase (CAT) und Superoxiddismutase (SOD) erscheint erhöht bei betroffenen Tieren als Ausdruck einer Imbalance zwischen Auftreten und Abbau reaktiver Sauerstoffgruppen (ROS). In diesem Zusammenhang stellt die Autorin eine Erhöhung von Peroxidationsmetaboliten des Lipid- (KANKOFER 2001c), Protein- (KANKOFER 2001b) und des Nukleinsäurestoffwechsels (KANKOFER u. SCHMEROLD 2002) bei Vorliegen einer Retentio secundinarum fest. Sie kann weiterhin eine Verbindung zwischen den reparativen Enzymen für DNS-Defekte PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase) und PARG (Poly(ADP-Ribose) Glykohydrolase) und dem Auftreten einer Nachgeburtsverhaltung nachweisen (KANKOFER u. GUZ 2003, KANKOFER et al. 2004).

In der erhöhten Blutkonzentration von bovinem „pregnancy-specific protein B“ (bPSPB), dessen biologische Funktion unbekannt ist, sehen TEFERA et al. (2001) zum Zeitpunkt der Geburt bei Tie-

ren mit Nachgeburtsverhaltung eine Verbindung zur Entstehung der Retentio secundinarum sowie dem Auftreten von Endometritiden.

Der Nachweis von bei Muttertier und Kalb übereinstimmendem (kompatiblen) Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I bei Vorliegen einer Retentio secundinarum (JOOSTEN et al. 1991, JOOSTEN u. HENSEN 1992, DAVIES et al. 2000, DAVIES et al. 2004) lässt die Autoren vermuten, dass „MHC Class I kompatible Trächtigkeiten“ beim Rind ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Nachgeburtsverhaltungen darstellen.

#### **2.4.2.1 Vergleichende Betrachtungen bei anderen Tierarten**

Bei der Stute liegt ein verzögerter Abgang der Nachgeburt vor, wenn die Secundinae nicht innerhalb der ersten drei Stunden post partum spontan und vollständig abgegangen sind, eine echte Nachgeburtsverhaltung bei einer Dauer des Ausstoßungsprozesses von mehr als sechs Stunden (SOBIRAJ 1996).

BLANCHARD u. VARNER (1993) diagnostizieren bei etwa vier Prozent untersuchter Stuten eine echte Retentio secundinarum, bei KANGASNIEMI (1995) liegt dieser Anteil bei 13 % und der für einen verzögerten Plazentaabgang bei zirka zehn Prozent.

Ein verzögerter Abgang der Secundinae tritt beim Pferd häufig in Folge einer postpartalen Uterusatonie auf und kommt meist bei Stuten mit Schweregeburten, Zwillingsgeburten, Eihautwassersucht oder alten Tieren vor (ARBEITER 1993). Weitere Ursachen werden in einer Subinvolution und verminderten Kontraktionsfähigkeit des Uterus, in einer Unreife der feto-maternalen Kontaktzone oder in einer gestörten Oxytozinfreisetzung, bzw. gestörten myometrialen Reaktion auf die Oxytozinfreisetzung gesehen (BLANCHARD u. VARNER 1993). Ein verzögerter Abgang der Nachgeburt bei vorherigen Abfohlungen erhöht die Rate einer erneuten Retentio secundinarum um das 2,9-fache, außerdem können bei Stuten mit Nachgeburtsverhaltung zwölf Stunden post partum niedrigere Serumkalziumkonzentrationen als bei Tieren ohne Störung des Plazentaabgangs nachgewiesen werden (SEVINGA et al. 2001).

Bei Schaf und Ziege wird eine Retention der Nachgeburt nur in Ausnahmefällen beschrieben und zwar im Zusammenhang mit einer mangelhaften Ernährung während der Trächtigkeit und nach Geburten von mehr als drei Lämmern. Auch beim Schwein tritt diese Erkrankung nur sporadisch auf, verläuft meist komplikationslos und ist in der Regel auf Wehenschwächen oder mechanische Verlegungen des weichen Geburtsweges zurückzuführen (GRUNERT 1993b).

## **2.5 Matrix-Metalloproteinasen und ihre Gewebehinhibitoren**

### **2.5.1 Allgemeine Betrachtungen**

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden zu einer Familie Zink-haltiger Endopeptidasen zusammengefasst, welche Aminosäuresequenzen von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), wie zum Beispiel Kollagen, Laminin, Elastin und/oder Fibronektin hydrolytisch spalten können. Die Enzyme sind in vier Subfamilien untergliedert (Tab. 2.2, S. 16) und spielen zum einen eine wichtige Rolle in physiologischen Abläufen der Bindegewebsmorphogenese und -entwicklung, der Wundheilung sowie der Neovaskularisation. Auf der anderen Seite sind die Metalloproteinasen an pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum, -metastasierung, Entzündungen oder auch beispielsweise Zahn- und Herzerkrankungen beteiligt (SANG 1998). Insgesamt handelt es sich also um elementare Vorgänge der Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion und/oder -migration (BAKER et al. 2002).

Bis heute wurden bei Vertebraten 26 Vertreter dieser in der Vergangenheit auch als „Matrixine“ (WOESSNER, JR. 1991) bezeichneten Proteinasen nachgewiesen.

Sie besitzen als einheitliche Strukturelemente eine Signalsequenz mit aktivierungsspezifischem Prosegment, eine katalytisch aktive Zink-haltige sowie eine substratspezifisierende Hämoexin-Domäne. Eine Sonderform stellen die membrangebundenen (membrane-type-; MT-) MMPs dar, die über die Hämoexin-Domäne membranassoziiert an Zelloberflächen gebunden sind (HERNANDEZ-BARRANTES et al. 2002).

Die Regulation der MMPs unterliegt zum einen einer Transkriptionskontrolle, beispielsweise durch Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine, zum anderen wird das inaktive Proenzym erst nach Ausschleusung aus der Zelle durch substratspezifische Interaktionen des Prosegments aktiviert, was im Rahmen von in vitro Versuchen neben den MMPs unter anderem auch bei organischen Quecksilberverbindungen oder anderen unspezifischen Proteasen nachgewiesen werden konnte (MATRISIAN 1990).

Neben der Aktivierung der MMPs spielt für deren Regulation im extrazellulären Stoffwechsel die Balance mit ihren Gewebehinhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases; TIMPs) eine wichtige Rolle. Bei Säugetieren sind bisher vier TIMPs nachgewiesen und näher charakterisiert worden. Mit einer C-terminalen Domäne sowie einer inhibitorisch interaktiven N-terminalen Subdomäne bei einem Molekulargewicht von etwa 21 kDa können grundsätzlich einheitliche Strukturelemente aufgezeigt werden, jedoch weisen diese Enzyme zahlreiche biochemische und funktionelle Besonderheiten auf, die auf eine sehr spezifische und individuelle Rolle jedes einzelnen Proteins im extrazellulären Meta-

bolismus schließen lassen.

Alle TIMPs sind in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, die proteolytische Wirkung aktivierter MMPs zu hemmen. Daneben wird ihnen eine Beteiligung an Wachstums- und Resorptionsvorgängen sowie an Tumorentstehung und -suppression zugeschrieben, die in keinem direkten Zusammenhang mit ihrem inhibitorischen Einfluss auf die MMPs stehen.

Mit Serumproteinen wie  $\alpha$ 2-Makroglobulin, Thrombospondin-1 und -2 oder dem „Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2; Serin Proteinase Inhibitor) sind weitere Proteine mit MMP hemmender Wirkung nachgewiesen worden, deren Wirkmechanismus nicht analog zu den TIMPs verläuft (BAKER et al. 2002). Die Arbeit von PUERTA et al. (2004) weist in diesem Zusammenhang auf eine weitere Gruppe von MMP-Inhibitoren mit sehr hoher Zink-Bindungsaffinität hin, die nicht in die Reihe der „klassischen“ TIMPs eingeordnet werden kann, sondern einen „Neuanfang“ in der Identifikation weiterer MMP-Inhibitoren darstellt.

**Tab. 2.2:** Übersicht über die Familie der MMPs (Auswahl; nach CURRY, JR. u. OSTEEN (2001))

Subfamilien (I-IV)	Vertreter (Beispiele)	enzymsspezifische Substrate (Beispiele)
<b>I (Kollagenasen)</b>	Interstitielle Kollagenase (MMP-1)	Kollagen Typ-I, -II, -III, Gelatine
	Neutrophile Kollagenase (MMP-8)	Kollagen Typ-I, -III
<b>II (Gelatinasen)</b>	72 kDa Gelatinase (MMP-2)	Kollagen Typ-I, -III; -IV, Laminin
	92 kDa Gelatinase (MMP-9)	Kollagen Typ-IV, Fibronectin
<b>III (Stromelysine)</b>	MMP-3	Fibronectin, Laminin
<b>IV (MT-MMPs)</b>	MT-MMP-15	Fibronectin, Gelatine, Laminin

## 2.5.2 Ausgewählte Matrix-Metalloproteinasen und Gewebeinhibitoren

Eine tabellarische Literaturübersicht über das Vorkommen ausgewählter MMPs und TIMPs in verschiedenen Geweben einzelner Spezies findet sich in Tab. 2.3 auf Seite 20.

### 2.5.2.1 Gelatinasen

Zur Subfamilie der Gelatinasen zählen unter anderem MMP-2 und MMP-9. Innerhalb ihrer katalytisch wirksamen Domäne besitzen sie eine „fibronectin-like“ Untereinheit, die, ähnlich der Stromelysin-Subfamilie, eine Bindung und Spaltung von Gelatine ermöglicht. Daneben sind diese Enzyme in der Lage, Hauptbestandteile von Basalmembranen wie Kollagen Typ-IV, Laminin und Fibronectin zu degradieren (CURRY, JR. u. OSTEEN 2001).

### 2.5.2.1.1 MMP-2

Synonyme Bezeichnungen des MMP-2 sind „Gelatinase-A“, aufgrund seiner hohen Substratspezifität zu Gelatine, „72kDa-Gelatinase“, entsprechend des Molekulargewichts seines inaktiven Proenzym oder auch „72kDa Typ-IV-Kollagenase“.

Neben seines Vermögens Kollagen Typ-IV sowie denaturierte Kollagene (Gelatine) zu spalten, legen Untersuchungen von AIMES u. QUIGLEY (1995) dar, dass MMP-2 im Unterschied zu MMP-9 in der Lage ist, ebenfalls Kollagen Typ-I-Triple-Helices zu spalten. HOWARD et al. (1991b) konnten für MMP-2 eine besondere Form der Autoaktivierung feststellen. Diese erfolgt, wenn aus dem stabilisierten MMP-2-/TIMP-2-Komplex der Inhibitor entfernt wird. Eine konzentrations-abhängige Hemmung von Pro-MMP-2 durch TIMP-4 wird von HERNANDES-BARRANTES et al. (2002) beschrieben.

Von NIKKARI et al. (1996) wird ein erhöhtes Auftreten von MMP-2 im Bereich entzündlich veränderter Arterien des Menschen intramural sowie in Makrophagen und von SCHNAPER et al. (1993) in Zellkulturen des humanen Umbilikalendothels beschrieben. Weiterhin weisen IURLARO et al. (1999) im Zusammenhang mit dem invasiven Wachstum von humanen Endometriumkarzinomen eine erhöhte MMP-2-Aktivität in Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen nach. Endothelzellen von Kontroll-Uterusbiopsien zeigen dagegen eine niedrigere MMP-2-Expression. Beim Hund liegen Befunde über eine verstärkte Expression dieses Enzyms im Bereich maligner Neoplasien im Vergleich zu gutartigen Wucherungen und bei Sarkomen, verglichen mit epithelialen Tumoren vor (LOUKOPOULOS et al. 2003).

Auch in humanen Trophoblastzellen während der gesamten Schwangerschaft sowie in maternalen Dezidualzellen im ersten Schwangerschaftsdrittel lässt sich MMP-2 nachweisen (POLETTE et al. 1994).

Beim Pferd ist der Nachweis von MMP-2 in aktiver und inaktiver Form im Uterussekret fünf bis acht Tage post partum beschrieben (KATILA et al. 2001).

VAGNONI et al. (1998a) können den immunhistologischen Nachweis von MMP-2 in variierender Intensität im maternalen und fetalen Epithel, Diplokaryozyten und kapillären Endothelzellen im letzten Gestationsdrittel der ovinen Plazenta erbringen.

### 2.5.2.1.2 MMP-9

MMP-9 (syn. „92kDa-Gelatinase“, „92kDa-Typ-IV-Kollagenase“) wird, wie oben erwähnt (Kapitel 2.5.2.1), ebenfalls in die Subfamilie der Gelatinasen eingeordnet.

Beim Menschen ist dieses Enzym zum Beispiel immunhistologisch in Ösophaguskarzinomzellen (DUNCAN et al. 1998), Makrophagen (NIKKARI et al. 1996, DUNCAN et al. 1998) sowie Granulozyten im Bereich des Uterus (VETTRAINO et al. 1996) nachweisbar. Darüber hinaus kommt MMP-9 im Epithel, Endothel und fibroblastenreichen Stroma der humanen fetalen Plazenta sowie im Drüsenepithel der Dezidua in frühen Gestationsstadien vor (HURSKAINEN et al. 1996). Auch POLETTE et al. (1994) bestätigen diese Befunde, weisen jedoch das Fehlen von MMP-9 in der humanen Plazenta im peripartalen Zeitraum nach.

Bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung des Pferdes (COPD) wird MMP-9 im Tracheal- und Bronchialsekret betroffener Tiere als potenter diagnostischer Marker für die Gewebeveränderungen angesehen (RAULO et al. 2001). Darüber hinaus ist beim Pferd der Nachweis von MMP-9, neben MMP-2, in aktiver und inaktiver Form auch im Uterussekret post partum beschrieben (KATILA et al. 2001).

#### **2.5.2.2 TIMP-1 und TIMP-2**

TIMP-1 ist als erstes als ein sezerniertes Glykoprotein identifiziert und näher charakterisiert worden, dessen inhibitorische Wirkung lokal in der extrazellulären Matrix durch Bindung an aktivierte MMPs im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 realisiert wird. Das Enzym zeigt ein breites Hemmungsspektrum für viele Metalloproteinasen, jedoch weist dieser Inhibitor eine besonders hohe Affinität zur Subfamilie der Kollagenasen MMP-1 und MMP-9 auf (CURRY, JR. u. OSTEN 2001).

Beim Menschen wird eine TIMP-1 und -2 Koexpression in Fibroblasten-Zellkulturen nachgewiesen (HOWARD et al. 1991a), wobei TIMP-2 eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu MMP-2 besitzt. In Versuchen mit humanen Endothel-Zellkulturen hemmen sowohl TIMP-1 als auch TIMP-2 das Zellwachstum („tube forming“) (SCHNAPER et al. 1993).

Anhand von Gefäßwandschäden bei Mäusen wird gezeigt, dass TIMP-1 die Migration glatter Muskelzellen sowie die Reendothelisierung alterierter Gefäße hemmt (LIJNEN et al. 1999). In humanem Plazentagewebe zu Beginn der Schwangerschaft ist TIMP-1 und TIMP-2 im Bereich des fetalen Stromas, des Endothels sowie großer, oberflächlicher Dezidualzellen nachweisbar, wohingegen im fetalen Zottenepithel und im Drüsenepithel der Dezidua lediglich TIMP-2 lokalisiert werden kann (HURSKAINEN et al. 1996). TIMP-1 und -2 sind im Verlauf der Schwangerschaft der Frau gleichmäßig in Dezidualzellen nachweisbar mit einem deutlichen Expressionsanstieg von TIMP-1 zur Geburt hin. Im fetalen Zottenstroma wird nur TIMP-1 und innerhalb der Trophoblastzellen lediglich TIMP-2 exprimiert (POLETTE et al. 1994).



Sowohl im Zyklus als auch in frühen Trächtigkeitsstadien des ovinen Endometriums zeigt sich ein gleichmäßiges Verteilungsmuster beider Inhibitoren (SALAMONSEN et al. 1995). Im letzten Gestationsdrittel wird in der Plazenta des Schafes der Nachweis von TIMP-1 im Karunkel- und Kotyledonenepithel, innerhalb der Uterindrüsen sowie im Kapillarendothel erbracht (VAGNONI et al. 1998).

### **2.5.2.3 Besonderheiten des MMP-2-/TIMP-2-Bindungskomplexes**

Wie bereits beschrieben (Kapitel 2.5.2.2), stellen alle TIMPs grundsätzlich lokale Inhibitoren der Metalloproteinasen in der extrazellulären Matrix dar.

Im Zusammenspiel von MMP-2 und TIMP-2 ergibt sich hierbei eine Besonderheit: Zum einen weisen ITOH et al. (1998) darauf hin, dass eine mögliche Aktivierung von Pro-MMP-2 in der extrazellulären Matrix über Zellmembran gebundene MT-MMPs vermittelt und durch TIMP-2 geblockt werden kann. Zum anderen beschreiben weitere Studien (HERNANDEZ-BARRANTES et al. 2000, TOTH et al. 2000, CURRY, JR. u. OSTEEN 2001, HERNANDEZ-BARRANTES et al. 2001, HERNANDEZ-BARRANTES et al. 2002, ZHAO et al. 2004), dass TIMP-2 im Komplex mit Pro-MMP-2 und MT1-MMP an der Zelloberfläche die Aktivierung der Proenzymen fördert und somit die Freisetzung von katalytisch wirksamem MMP-2 unterstützt.

### **2.5.2.4 Besondere Betrachtungen beim Rind**

Über das Vorkommen von Metalloproteinasen und ihrer Gewebeinhibitoren beim Rind und speziell in dessen Genitale liegen in der verfügbaren Literatur nur einzelne Arbeiten vor: Glatte Muskelzellen boviner Pulmonalarterien zeigen unter Behandlung mit Nitritperoxiden eine deutliche Stimulation von MMP-2 (CHAKRABORTI et al. 2004). In Endothelzellen der Aorta des Rindes deutet das Vorkommen von MMP-2 und MMP-9 auf eine Beteiligung dieser Enzyme am Migrationsvermögen aortaler glatter Muskelzellen hin (VON OFFENBERG et al. 2004).

MMP-2 und MMP-9 lassen sich in Verbindung mit der Ovarfollikelentwicklung unter Einfluss von Follikel-Inhibin und Steroidhormonen nachweisen (IMAI et al. 2003). Versuche mit bovinen endometrialen Zellkulturen (HASHIZUME et al. 2003) ergeben einen deutlichen Anstieg beider Metalloproteinasen in den Endometriumzellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trophoblastzellen. Zymographische Analysen von Uterusgewebe zeigen in der Frühträchtigkeit des Rindes eine Dominanz von MMP-2 gegenüber MMP-9 sowie eine auf das Stroma beschränkte Synthese von TIMP-1.

Vergleichbare Untersuchungen am nicht tragenden Uterus ergaben keine Abweichungen (HASHIZUME et al. 2003).

**Tab. 2.3:** Literaturübersicht über das Vorkommen ausgewählter MMPs und TIMPs in verschiedenen Geweben einzelner Spezies (Auswahl)

Enzym	Gewebe/Zellpopulation: Spezies
<b>MMP-2</b>	Makrophagen: Mensch <sup>1,3</sup>
	Tumorzellen: Mensch <sup>3</sup> ; Hund <sup>4</sup>
	Gefäßwand: Mensch <sup>2,3</sup> ; Rind <sup>6,14</sup>
	Ovar: Rind <sup>15</sup>
	Placenta materna: Mensch <sup>3,5</sup> ; Schaf <sup>6</sup> ; Rind <sup>16,17,18</sup>
	Placenta fetalis: Mensch <sup>5</sup> ; Schaf <sup>6</sup> ; Rind <sup>17,18</sup>
<b>MMP-9</b>	Makrophagen: Mensch <sup>1,7,8</sup>
	Tumorzellen: Mensch <sup>7</sup>
	Gefäßwand: Mensch <sup>5,9</sup> ; Rind <sup>14</sup>
	Ovar Rind: <sup>15</sup>
	Placenta materna: Mensch <sup>5,8,9</sup> ; Rind <sup>16,17,18</sup>
	Placenta fetalis: Mensch <sup>5,9</sup> ; Rind <sup>18</sup>
<b>TIMP-1</b>	Fibroblasten: Mensch <sup>10</sup>
	Gefäßwand: Mensch <sup>2</sup> ; Maus <sup>11</sup> ; Schaf <sup>13</sup>
	Placenta materna: Mensch <sup>9</sup> ; Schaf <sup>12,13</sup> ; Rind <sup>16</sup>
	Placenta fetalis: Mensch <sup>8,5</sup> ; Schaf <sup>13</sup>
<b>TIMP-2</b>	Fibroblasten: Mensch <sup>10</sup>
	Gefäßwand: Mensch <sup>2</sup> ; Schaf <sup>13</sup>
	Placenta materna: Mensch <sup>9</sup> ; Schaf <sup>12</sup> ; Rind <sup>18</sup>
	Placenta fetalis: Mensch <sup>5,9</sup> ; Schaf <sup>13</sup>

Legende zu Tab. 2.3:

- 1 NIKKARI et al. (1996)
- 2 SCHNAPER et al. (1993)
- 3 IURLARO et al. (1999)
- 4 LOUKOPOULOS et al. (2003)
- 5 POLETTE et al. (1994)
- 6 VAGNONI et al. (1998)
- 7 DUNCAN et al. (1998)
- 8 VETTRAINO et al. (1996)
- 9 HURSKAINEN et al. (1996)
- 10 HOWARD et al. (1991a)
- 11 LIJNEN et al. (1999)
- 12 SALAMONSEN et al. (1995)
- 13 CHAKRABORTI et al. (2004)
- 14 OFFENBERG et al. (2004)
- 15 IMAI et al. (2003)
- 16 HASHIZUME et al. (2003)
- 17 MAJ u. KANKOFER (1997)
- 18 WALTER u. BOOS (2001)

Untersuchungen zum Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Gewebeinhibitoren in Verbindung mit dem Auftreten einer Nachgeburtsverhaltung beim Rind sind in der zur Verfügung stehenden Literatur nur vereinzelt aufgeführt: Bei Vorliegen einer Retentio secundinarum weisen MAJ u. KANKOFER (1997) zymographisch eine geringere Pro-MMP-9-Expression im maternalen Plazentagewebe und in beiden plazentaren Kompartimenten eine erhöhte Expression von Pro-MMP-2 nach, verglichen mit Plazentagewebe von Kühen mit ungestörtem Abgang der Secundinae. Die Autoren konstatieren weiterhin eine Differenz in der Expression von aktivem MMP-2 zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. WALTER u. BOOS (2001) weisen im graviden bovinen Uterus immunhistologisch MMP-2 im maternalen Stroma und im Chorionepithel, MMP-9 im maternalen Stroma und Epithel sowie im Chorionepithel und TIMP-2 ausschließlich im Bereich der Diplokaryozyten nach. Ei-

nen Unterschied im Expressionsmuster zwischen Tieren mit und ohne Nachgeburtshaltung kann nicht festgestellt werden.

### 3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Tiergut, Material und Probenherkunft

Als Untersuchungsmaterial standen von 51 Kühen jeweils eine intra partum/operationem (Probe A) und/oder 24 Stunden post partum/operationem (Probe B) entnommene Plazentomprobe zur Verfügung (Anhang, Tab. 9.1, S. I), die im Zeitraum von 1999 bis 2000 in der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, bzw. der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig im Rahmen der Geburtsüberwachung entnommen wurden.

Darüber hinaus standen Plazentomproben weiterer acht Versuchstiere (Gruppe IV) aus der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover aus den Jahren 2000 bis 2001 zur Etablierung immunhistologischer Methoden zur Verfügung (Anhang, Tab. 9.1, S. I). Diese Proben wurden nicht in die weiteren eigenen Untersuchungen mit einbezogen.

Bei allen Tieren handelt es sich um klinisch gesunde Rinder verschiedener Rassen und Nutzungsrichtungen aus mehreren Klein- und Großbetrieben in Mittel- und Westdeutschland.

Es wurden ausschließlich Tiere in den Versuch aufgenommen, deren anamnestische und klinische Daten bezüglich Trächtigkeitsdauer, Geburtsverlauf, Art und Weise etwaiger Geburtshilfe und der Puerperalverlauf bis mindestens 24 Stunden post partum bekannt waren. Anhand der klinischen Daten des Geburtsverlaufes erfolgte eine Einteilung der Tiere in drei Gruppen Tab. 3.1, S. 22:

In der Gruppe I wurden als Kontrolle fünf Kühe mit termingerechter, komplikationsloser Spontangeburt und ungestörtem Abgang der Secundinae zusammengefasst (Tab. 3.1, S. 22).

Gruppe II beinhaltet 31 Tiere, deren Kälber mittels vorzeitiger Schnittentbindung nach einmaliger parenteraler Prostaglandin-Injektion (2ml Estrumate©) entwickelt wurden, alle mit klinischer Diagnose einer Retentio secundinarum (Tab. 3.1, S. 22).

Gruppe III umfasst 15 Kühe, bei denen nach klinischer Indikation ein Kaiserschnitt oder geburtshilfliche Maßnahmen erforderlich waren, bei sieben dieser Tiere manifestierte sich eine Nachgeburtshaltung (Tab. 3.1, S. 22).

Für die weiteren Untersuchungen war insbesondere entscheidend, dass bei definierter Gestationsdauer der klinische Puerperalverlauf feststand, also das Ausbleiben oder Auftreten einer Retentio secundinarum totalis. Tiere mit der klinischen Diagnose einer so genannten „Teil-Retentio“, ebenso wie

Tiere mit einer Torsio uteri als Form der Geburtsstörung wurden für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

**Tab. 3.1:** Übersicht über die Gruppeneinteilung des Tiergutes anhand der anamnestisch-klinischen Daten

Gruppe		I (n=5)	II (n=31)	III (n=15)
<b>Alter (in Jahren)</b>	<6	3	21	14
	6-10	2	5	0
	?	0	5	1
<b>Rasse</b>	Schwarzbunt	4	27	13
	Rotbunt	1	2	1
	sonstige	0	1	1
	?	0	1	0
<b>Tragezeit (in Tagen)</b>	<275	0	31	0
	280 <sup>+</sup> /-5	5	0	13
	>285	0	0	2
<b>Geburtsverlauf</b>	zu große Frucht	0	0	8
	Kaiserschnitt	0	31	9
	konservative Geburtshilfe	0	0	6
	PGF <sub>2α</sub>	0	31	0
	Spontangeburt	5	0	0
	?	0	0	5
<b>Puerperium</b>	o.b.B.	5	0	8
	Retentio secundinarum.	0	31	7

Legende zu Tab. 3.1:

- I:** Kontrollgruppe  
**II:** PGF<sub>2α</sub>-Gruppe  
**III:** klinische Gruppe  
**PGF<sub>2α</sub>:** vorzeitig mit PGF<sub>2α</sub> eingeleitete Geburt  
**o.b.B.:** ohne besonderen Befund  
**?:** unbekannt

### 3.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung

Nach klinisch-gynäkologischer Untersuchung durch den behandelnden Tierarzt wurden die Tiere zum Zeitpunkt der Geburt (Probe A) sowie 24 Stunden später (Probe B) einer Plazentomexstirpation unterzogen. Es wurden, mit Ausnahme der Kaiserschnitt-Patienten, bei denen die Probenentnahme unmittelbar intra operationem durch Abbinden erfolgen konnte, über die Zervix vollständige Plazentome an deren Basis durch manuelles Abdrehen entnommen und unmittelbar in vier prozentigem, neutral gepuffertem Formalin fixiert, bzw. für die Elektronenmikroskopie zu einem späteren Zeit-

punkt in drei prozentigem Glutaraldehyd umfixiert und an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig gesandt.

### 3.3 Histologische Präparation

Die formalinfixierten Proben für die Lichtmikroskopie wurden nach dem Standardverfahren im Hypercenter XP (Fa. Shandon, Frankfurt) in Paraplast (Fa. Vogel, Gießen) eingebettet. Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) wurden 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) (ROMEIS 1989) angefärbt (Anhang 9.3, S. VII).

### 3.4 Methodik der lichtmikroskopischen Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate wurde mit einem Standardmikroskop der Fa. OLYMPUS unter Verwendung von 4er, 10er und 40er Objektiven durchgeführt.

An allen Plazentomproben erfolgte eine genaue histomorphologische Charakterisierung des plazentaren Reifegrades (Tab. 3.2). Darüber hinaus fand eine Beurteilung der histopathologisch zu erfassenden Veränderungen (Entzündung, Angiosklerose, Ödem, Blutung, Verkalkung, etc.) statt.

**Tab. 3.2:** Kriterien zur Erfassung des morphologischen Reifegrades der Plazentome zum Zeitpunkt der Geburt/Seccio caesarea (A) und 24 Stunden post partum (B)

<i>Placenta</i>		<i>matura</i>		<i>immatura</i>		<i>matura retardata</i>	
		A	B	A	B	A	B
<i>materna</i>	<b>Kryptenepithel</b>	-	-	+++		+	
	<b>neutrophile Granulozyten</b>	(+)	+	(+)		(+)	
	<b>Ödem</b>	++	+++	-		+	
<i>fetalis</i>	<b>Chorionepithel</b>	+	(+)	+++		++	
	<b>Diplokaryozyten</b>	(+)	-(+)	+++		++	
	<b>neutrophile Granulozyten</b>	(+)	-	(+)		(+)	
	<b>Ödem</b>	(+)	-	+		++	

Legende zu Tab. 3.2:

- |      |                            |      |                        |
|------|----------------------------|------|------------------------|
| -:   | nicht nachweisbar          | ++:  | mittelgradig           |
| (+): | angedeutet/ganz vereinzelt | +++: | hochgradig/durchgehend |
| +:   | geringgradig/individuelle  |      |                        |

### 3.5 Methodik der enzymhistochemischen Untersuchungen

An 26 repräsentativ ausgewählten Schnitten sowohl der Kontroll- als auch der Versuchsgruppen (Tab. 3.5, S. 26) wurde die Aktivität der CIAE (Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase) (Anhang 9.1, S. III) untersucht.

Als Ausdruck der Aktivität der CIAE sind, innerhalb der als positiv zu beurteilenden Zellen, deutliche feingranuläre, intrazytoplasmatische, rot gefärbte Reaktionsprodukte feststellbar.

Als Positivkontrolle für die Darstellung der CIAE diente eine aus in der Routinediagnostik stammende Hautbiopsie eines Rindes mit einer Dermatitis purulenta.

Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen wurde anhand von fünf Gesichtsfeldern in einer 40er Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgezählt und bewertet, wobei die Intensität der Anfärbung unberücksichtigt ist. Folgende Bewertungen wurden vorgenommen: keine positiven Zellen (0); geringe (1-5), mäßige (6-20) und große (>20) Anzahl an positiv reagierenden Zellen.

### 3.6 Methodik der immunhistologischen Untersuchungen

Entsprechend der enzymhistochemischen Untersuchungsmethodik (Kapitel 3.5, S. 24) wurden an repräsentativ ausgewählten Plazentomproben von insgesamt 26 Kühen der Kontroll- und der Versuchsgruppen (Tab. 3.5, S. 26) immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

Zunächst erfolgten zur Etablierung der Methodik Vorversuche für den Nachweis von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2. Die verwendeten Antikörper und die Vorbehandlungsverfahren wurden anhand des zusätzlichen Einsendungsmaterials weiterer Versuchstiere (Gruppe IV) der TiHO Hannover (2000-2001; Kapitel 3.1, S. 21) getestet und die optimale Antikörperverschüttung ausgetitriert.

Repräsentative Proben der Kontrollgruppe sowie der Versuchsgruppen (Tab. 3.5, S. 26) wurden immunhistologisch mit den in Tab. 3.3, Seite 25 aufgeführten Primärantikörpern näher charakterisiert.

Als Positivkontrollen dienten für Desmin und  $\alpha$ -Aktin die im Schnitt eindeutig identifizierbare Gefäßmuskulatur, für Vimentin die plazentaren Stromazellen, für Laminin und Kollagen Typ-IV die Basalmembranen und für Kollagen Typ-I und Typ-III das perivaskuläre Stroma der maternalen Blutgefäße. Für den Nachweis der Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren wurde eine Endometriumbiopsie eines zyklisch aktiven Rindes benutzt.

Als Negativkontrollen dienten jeweils parallel mit Kaninchen-Kontrollserum bzw. mit einem monoklonalen Antikörper gegen Hühner-Bursa-Lymphozyten (HIRSCHBERGER 1987) inkubierte Schnitte.

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune Reaktionsprodukte gewertet, die in der Negativkontrolle nicht nachweisbar waren. Die jeweiligen Reaktionsmuster der verwendeten Antikörper sind in Tab. 3.3, Seite 25 aufgeführt. Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen und ihre Färbeintensität wurden semiquantitativ geschätzt und in Prozent angegeben.

**Tab. 3.3:** Verwendete Primärantikörper - Reaktionsmuster

Primärantikörper		Reaktionsmuster
ER, PR	Steroidhormonrezeptoren	intranukleär
Vimentin	Intermediärfilament mesenchymaler Zellen	intrazytoplasmatisch
Desmin	Intermediärfilament quergestreifter und glatter Muskelzellen	intrazytoplasmatisch
Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -Aktin)	Mikrofilament glatter Muskelzellen	intrazytoplasmatisch
Laminin	Basalmembrankomponente	extrazellulär
Kollagen Typ-I	Strukturprotein der extrazellulären Matrix	extrazellulär
Kollagen Typ-III	Strukturprotein der extrazellulären Matrix	extrazellulär
Kollagen Typ-IV	Basalmembrankomponente	extrazellulär
MMP-2	proteolytisches Enzym	intrazytoplasmatisch/ extrazellulär
TIMP-1; TIMP-2	inhibitorische Enzyme	intrazytoplasmatisch

Die verschiedenen Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen werden im Anhang 9.2, Seite III detailliert beschrieben.

Die Erfassung der Expression von Hormonrezeptoren erfolgte semiquantitativ anhand eines modifizierten „Immunreaktiven Scores“ (IRS) (ÖZGEN et al. 1997) nach folgender Formel:

$$IRS = 1/100 \sum_{n=2}^4 \{PP_n \times \max [\varphi \times (SI_n - 1), 1]\}$$

mit	Laufindex	n	Prozentsatz positiver Zellen	PP
	Skalierungsfaktor	$\varphi = 5$	Färbeintensität	SI

Der IRS kann nach dieser Berechnungsmethode einen Wert von null bis zehn einnehmen.



**Tab. 3.4:** Zuordnung von Färbeintensität und SI-Wert

Laufindex n	Färbereaktion	Wert
1	keine	0
2	schwach	1
3	mäßig	2
4	stark	3

Das eisenhaltige Pigment Hämosiderin, das infolge des Blutabbaus in den Makrophagen und Epithelzellen liegen kann, ist auch in der Negativkontrolle als hellbraunes, granuläres Material nachweisbar und ist somit von einer positiven immunhistologischen Reaktion eindeutig abgrenzbar.

Ebenfalls als „negativ“ werden hellbraune, homogene, extrazelluläre Anfärbungen im Bereich von entnahmebedingten Gewebequetschartefakten und in den Arealen mit Plasmainsudationen innerhalb der Gewebeproben bewertet.

**Tab. 3.5:** Übersicht über die Probenauswahl für die enzymhistochemischen und immunhistologischen Untersuchungen

Gruppe	Gestationsdauer in Tagen	Geburtsverlauf	Puerperalverlauf	Probenanzahl	
				A	B
<b>I (n=5)</b>	280±5	o.b.B.	o.b.B.	3	2
<b>II (n=12)</b>	<275	Kaiserschnitt nach PGF <sub>2α</sub> -Applikation	Total-Ret. sec.	12	12
<b>III (n=7)</b>	280±5	Kaiserschnitt	Total-Ret. sec.	5	5
		kons. Geburtshilfe	Total-Ret. sec.	2	2

Legende zu Tab. 3.5 (siehe auch Legende zu Tab. 3.1, S. 22):

A: Probe A (intra partum/operationem)

B: Probe B (24 Stunden post partum/operationem)

### 3.7 Methodik der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Die in dreiprozentiges Glutaraldehyd umfixierten Proben (Kapitel 3.2, S. 22) wurden mit dreiprozentigem Cacodylat gepuffertem Osmiumtetroxyd für zwei Stunden bei 4 °C nachfixiert. Die Einbettung des Materials erfolgte in einer Glycidether 100-Mischung (Fa. Roth, Karlsruhe) nach einem standardisierten Verfahren. Von den zugetrimmten Blöcken (TM6, Fa. Reichert AG) wurden 0,3-0,5 µm dicke Semidünnschnitte mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Fa. Reichert AG, Wien) angefertigt und diese mit 1 % iger Toluidinblau-Lösung angefärbt. Entsprechend der am Semidünnschnitt ausgewählten Bereiche erfolgte eine erneute Zutrimmung der Blöcke mit einer Rasierklinge und mit einem Diamantmesser der Firma Diatom (Leica Vertrieb GmbH, Stuttgart) die Herstellung 60 – 90 nm dicker Ultradünnschnitte. Die Schnitte wurden auf Formvar (Fa. Serva, Heidelberg) befilmte Kupfer-

netze (Fa. Tesla, Brno, Slowakei) aufgezogen. Die Doppelkontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte mit Uranylacetat (7 min) und Bleicitrat (10 min) (REYNOLDS 1963).

Die Auswertung der Ultradünnschnitte wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV und 3.000-125.000 facher Gerätevergrößerung vorgenommen. Als Aufnahmematerial dienten Kodak Electron Microscope Filme (Kodak co. 4489, Rochester, New York, USA). Die Negative wurden in einer Entwicklerlösung (Kodak D19 von Plano W, Planet GmbH, Wetzlar) bei 20 °C entwickelt, fixiert, in Leitungswasser gewässert und bei Raumtemperatur getrocknet. Mittels eines Belichtungsautomaten (Durst Laborator 1200, Durst GmbH, Brixen) konnten die Negative auf schwarz/weiß Fotopapier (TT Speed, Teranal Photowerk GmbH & Co., Norderstedt) abgezogen werden. Die Entwicklung erfolgte in 1:9 verdünntem Fotopapierentwickler (Eukobrom, Tetenal Photowerk GmbH & Co., Norderstedt). Anschließend wurden die Bilder bei Raumtemperatur fixiert, in Leitungswasser gewässert und mit einem RC-Trockner 30 (Fa. Kindermann & Co. GmbH, Ochsenfurt) getrocknet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Zusammenhang zwischen den anamnestisch-klinischen Daten der Tiere und dem Auftreten einer Retentio secundinarum

Eine Gestationsdauer von weniger als 275 Tagen (Gruppe II; n=31) stellte innerhalb der zur Verfügung stehenden Daten des untersuchten Tiergutes das einzige anamnestisch-klinisch relevante Kriterium im Zusammenhang mit der Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung dar. Dagegen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Alter oder der Rasse der Tiere und dem Auftreten einer Retentio secundinarum nicht festgestellt werden.

Etwa ein Viertel der Probanden (25,8%) aus dem zur Verfügung stehenden Tiergut, bei denen nach physiologischer Trächtigkeitsdauer aus klinischer Sicht eine konservative Geburtshilfe oder ein Kaiserschnitt notwendig waren (Gruppe III), entwickelte eine Nachgeburtsverhaltung. Bei der Hälfte dieser Retentio-Patienten lag die Indikation für den klinischen Eingriff in einer Torsio uteri, bei vier Tieren in der Größe der Frucht und bei zwei Tieren waren diesbezüglich keine Daten verfügbar.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass Proben derjenigen Tiere mit Torsio uteri nicht mit in die weiteren Untersuchungen einbezogen wurden.

### 4.2 Befunde bei Kühen mit termingerechter Spontangeburt und ungestörtem Abgang der Secundinae (Gruppe I; Kontrollgruppe; n=5)

#### 4.2.1 Lichtmikroskopische Befunde

Mittels der H.-E.-Färbung kann bei allen fünf Tieren der Gruppe I, also nach termingerechter Normalgeburt und ungestörtem Nachgeburtsabgang eine *morphologische Reife* der untersuchten Plazentaanteile (Placenta matura) festgestellt werden. Im Folgenden werden die Charakteristika der *morphologischen Reife* anhand einzelner Strukturelemente (siehe auch Kapitel 3.4, Tab. 3.2, S.23) der Placenta materna und fetalis matura zum Zeitpunkt der Geburt (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B) kurz dargestellt.

#### 4.2.1.1 Placenta materna matura

Die Placenta materna, die sogenannte Karunkel (Anhang 9.4, Abb. 9.1A, S. IX), setzt sich aus der Epithelauskleidung, dem stromalen, kapillarenreichen Grundgerüst der Krypten sowie dem stielnahen, größere Gefäße führenden Stroma der Karunkelbasis zusammen.

Zum Zeitpunkt der Geburt hat sich eine weitgehende Desintegration und numerische Reduktion des maternalen Kryptenepithels vollzogen, es sind lediglich in einzelnen Krypten kubische bis abgeflachte Zellen oder Zellgruppen nachweisbar, die kleine, rundliche, zentral gelegene, heterochromatinreiche Kerne in einem schwach eosinophilen Zytoplasma beinhalten (Anhang 9.4, Abb. 9.2A, S. IX). 24 Stunden post partum sind diese Zellen weitgehend nicht mehr darstellbar.

Der Karunkelstiel zeigt in Probe A eine mittelgradige Ödematisierung des Interstitiums, im peripheren Stroma der Karunkelkrypten ist dieses Ödem weniger deutlich ausgeprägt (Anhang 9.4, Abb. 9.2A, S. IX). Die Stromazellen erscheinen metabolisch aktiv in Form bauchiger, zytoplasmareicher Zellen mit großen, runden, heterochromatinreichen Nuclei. Die extrazelluläre Matrix stellt sich „hyalin verquollen“ dar. Dieses stromale Ödem ist vor allem im Bereich der Karunkelbasis 24 Stunden nach der Geburt weiterhin erkennbar, in zwei Fällen sogar noch intensiver ausgeprägt.

Bei den intra partum gewonnenen Proben ist eine geringgradige Hyperämie der peripheren Kapillaren sowie der größeren Gefäße des Karunkelstiels nachweisbar. 24 Stunden später zeigen sich in den meisten Fällen lediglich deutlich hyperämische periphere Kapillaren, die Mehrzahl der größeren Venen hingegen erscheint kollabiert. Zu beiden Entnahmezeitpunkten können nur in Einzelfällen innerhalb stielnaher Gefäße hyaline Gerinnungsthromben beobachtet werden.

Bei diesen Kontrolltieren finden sich in Probe A im Stroma lediglich sehr spärlich neutrophile Granulozyten, 24 Stunden später sind wenige neutrophile Granulozyten, gleichmäßig im Gewebe verteilt, darstellbar.

In drei Fällen sind zum ersten Entnahmezeitpunkt im Bereich der Karunkelbasis sowie des fetomaternalen Spaltraums lokal geringgradige frische Blutungen sichtbar.

Die wichtigsten morphologischen Befunde der Placenta materna matura sind in Tab. 4.1, Seite 30, bzw. in Abb. 4.1A, Seite 31 zusammengefasst.

**Tab. 4.1:** Zusammenfassung der wichtigsten **morphologischen Befunde** an einer **Placenta materna matura** zum Zeitpunkt der Geburt (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

<b>Placenta materna matura</b>					
<b>Gruppe I (n=5)</b>	<b>Kryptenepithel</b>	<b>neutrophile Granulozyten</b>	<b>Ödem</b>	<b>Hyperämie</b>	<b>hyaline Thromben</b>
<b>Probe A</b>	-	(+)	++	++	-
<b>Probe B</b>	-	+	++	-	(+)

Legende zu Tab. 4.1:

-: nicht nachweisbar

(+): angedeutet/ganz vereinzelt

+: geringgradig/einzelne

++: mittelgradig

#### 4.2.1.2 Placenta fetalis matura

Die Untersuchungen der Placenta fetalis, der so genannten Kotyledone, beziehen sich auf das Chorionepithel, das darunter liegende, Kapillaren führende Stroma der Tertiärzotten im Lumen der maternalen Krypten sowie die nachweisbaren Anteile des die Karunkel umhüllenden Allantochorions. Weiterhin sind die innerhalb der Chorionepithelzellgruppen liegenden fetalen Riesenzellen, die Diplokaryozyten, von Interesse.

Intra partum stellen sich die Chorionepithelzellen der Placenta fetalis als teils freie, teils mit der luminalen Kryptenwand in Kontakt stehende Zellgruppen oder Einzelzellen dar (Anhang 9.4, Abb. 9.2A, S. IX). Sie zeigen pleomorphe, in der Größe variierende, vorwiegend zentral liegende, heterochromatinreiche Zellkerne in einem schwach eosinophilen, schaumigen Zytoplasma. Neben intakten Zellen sind auch Stadien einer vakuolären Zelldegeneration, bzw. Zellfragmente vorhanden. 24 Stunden später fehlen diese intakten epithelialen Anteile der fetalen Plazenta stets, es kommen lediglich Zellfragmente im Kryptenlumen sowie optisch leere Krypten vor, die dann mehr oder weniger kollabiert erscheinen.

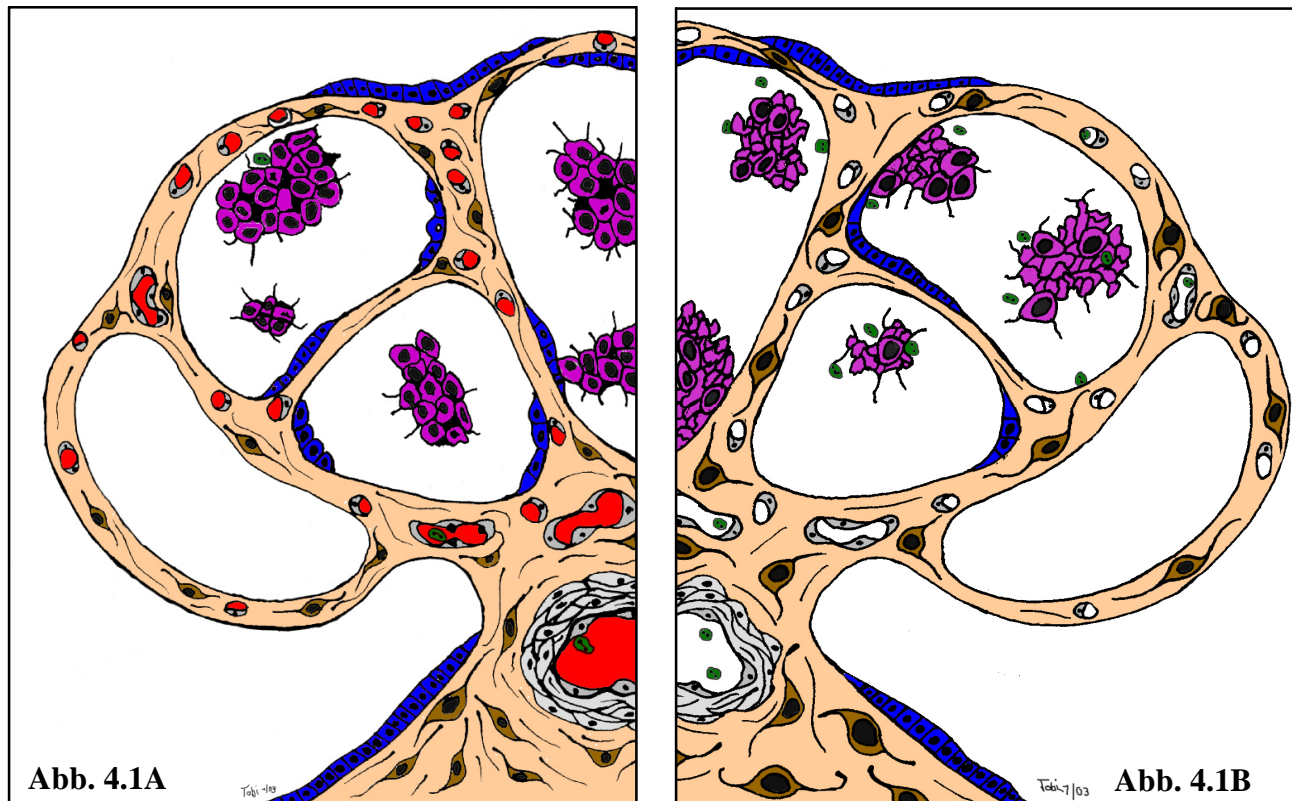
Die fetalen Tertiärzotten weisen in Probe A, und, soweit in Probe B darstellbar, einen kapillarisierten bindegewebigen Grundstock mit einem geringgradigen stromalen Ödem auf.

Anteile des Allantochorions sind zur Geburt lediglich in zwei Fällen nachweisbar. In dessen mittelgradig ödematisiertem, weitmaschigem und zellarmem bindegewebigem Grundgerüst können regelmäßig mittelgradig hyperämische Arterien, Venen und Kapillaren gefunden werden. Zum zweiten Entnahmezeitpunkt sind Anteile des Allantochorions nicht mehr vorhanden.

Neben den beschriebenen Chorionepithelzellen treten peripartal einzelne (maximal drei Zellen/Gesichtsfeld/40er Objektiv) mäßig zytoplasmareiche Diplokaryozyten mit deutlich eosinophilem, feingranulärem Zytoplasma auf (Tab. 4.13, S. 51). Sie liegen entweder einzeln, frei im Kryptenlumen oder innerhalb fetaler Epithelzellgruppen und/oder in Kontakt zur maternalen Kryptenwand. Diese


Zellen sind deutlich größer als die benachbarten Chorionepithelien und weisen in der Regel zwei, ganz vereinzelt auch drei sehr große, runde bis ovoide, heterochromatinreiche Zellkerne auf. In Probe B sind diese Riesenzellen nur noch sehr vereinzelt, bzw. gar nicht zu beobachten (Tab. 4.13, S. 51).

Die wichtigsten morphologischen Befunde der Placenta fetalis matura sind in Tab. 4.2, Seite 32, bzw. in Abb. 4.1B zusammengefasst.



**Abb. 4.1A und B:** Schematische Darstellung der **morphologischen Befunde** an einer **Placenta materna et fetalis matura** zum Zeitpunkt der Geburt (A) und 24 Stunden post partum (B)

Legende zu Abb. 4.1A und B:

	maternales Epithel		maternales Stroma
	fetales Epithel		Gefäße/Kapillaren
	neutrophile Granulozyten		deutliche Hyperämie

**Tab. 4.2:** Zusammenfassung der wichtigsten **morphologischen Befunde** an einer **Placenta fetalis matura** zum Zeitpunkt der Geburt (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

<b>Placenta fetalis matura</b>						
<b>Gruppe I (n=5)</b>	<b>Chorion- epithel</b>	<b>Diplokaryo- zyten</b>	<b>neutrophile Granulozyten</b>	<b>Ödem</b>	<b>Hyperämie</b>	<b>hyaline Thromben</b>
<b>Probe A</b>	+	(+)	(+)	+	++	-
<b>Probe B</b>	(+)	-(+)	-	-	-	-

Legende zu Tab. 4.2 siehe Legende zu Tab. 4.1, Seite 30

#### 4.2.2 Enzymhistochemische Befunde

Im Rahmen der enzymhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis der Chlorazetatesterase (Cl-AE) im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten fallen bei allen fünf Tieren, korrelierend mit den lichtmikroskopischen Befunden (Kapitel 4.2.1.1, S. 29), in Probe A in allen untersuchten Lokalisationen nur sehr vereinzelt neutrophile Granulozyten auf (maximal vier Zellen/Gesichtsfeld/40er Objektiv). Lediglich in einem Fall können in einer stielnahen Lokalisation acht und in der Peripherie fünf Zellen je untersuchtem Gesichtsfeld nachgewiesen werden. 24 Stunden später steigt die Zellzahl mäßig auf maximal 20 Zellen pro untersuchtem Gesichtsfeld an.

#### 4.2.3 Immunhistologische Befunde

Die immunhistologischen Untersuchungen der fünf Kontrolltiere dienen als Ergänzung des „morphologischen Normalbefundes“ einer bovinen Plazenta unmittelbar und 24 Stunden nach komplikationsfreier Spontangeburt. Diese immunhistologischen Befunde werden im Folgenden anhand einzelner ausgewählter Strukturelemente der Placenta materna und fetalis dargestellt.

##### 4.2.3.1 Placenta materna matura

Eine aussagekräftige immunhistologische Beurteilung des maternalen Kryptenepithels ist zu beiden Entnahmezeitpunkten aufgrund der oben beschriebenen (Kapitel 4.2.1.1, S. 29) weitgehenden numerischen Reduktion und Desintegration dieser Zellen nicht möglich. Die Basallamina des Kryptenepithels hingegen ist kontinuierlich und deutlich positiv für Kollagen Typ-IV und Laminin (Anhang 9.4, Abb. 9.3A (Inset), S. XI).

Die maternalen Stromazellen der peripheren, die Krypten umgebenden Septen zeigen in beiden Proben zu über 90% eine hochgradige Vimentin- und mittelgradige  $\alpha$ -Aktin- sowie in etwa 60% der Zellen eine mittelgradige Desmin-Expression. Die stielnahen Stromazellen im Bereich der Karunkel-

basis exprimieren intra und post partum Vimentin hochgradig in über 90%,  $\alpha$ -Aktin mittelgradig in etwa 70% und Desmin mittelgradig in etwa 80% der Zellen (Anhang 9.4, Abb. 9.4A, S. XI). Auffälligerweise ist im Bereich des stielnahen Stromas multifokal in etwa 40% der Stromazellen ein geringgradiger, intrazytoplasmatischer Nachweis von Laminin darstellbar.

Die extrazelluläre Matrix im Interstitium der peripheren Septen ist ausschließlich positiv für Kollagen Typ-I. Im Stroma der Karunkelbasis lassen sich sowohl Fasern vom Kollagen Typ-I als auch Kollagen Typ-III deutlich und gleichmäßig verteilt nachweisen. Immunhistologisch auffällige Unterschiede hinsichtlich des Entnahmezeitpunktes können im Bereich des maternalen Stromas nicht festgestellt werden.

Periphere maternale Arteriolen und Venulen zeigen, unabhängig von der Lokalisation, eine mittel- bis hochgradige Expression von Vimentin in den Endothelzellen und von  $\alpha$ -Aktin und Desmin im Bereich der Perizyten. Die größeren stielnahen Gefäße der Karunkelbasis weisen eine hochgradige Vimentin-Expression in den Endothelzellen, den Mediamyozyten und den Stromazellen der Tunica adventitia sowie eine mittelgradige Expression von  $\alpha$ -Aktin und Desmin in den Mediamyozyten auf. Die subendotheliale Basallamina stellt sich kontinuierlich positiv für Kollagen Typ-IV und Laminin dar.

Perivaskulär kann im Bereich der peripheren Kapillaren Kollagen Typ-I und im Bereich der stielnahen, größeren Gefäße sowohl Kollagen Typ-I als auch Kollagen Typ-III, deutlich und gleichmäßig verteilt, dargestellt werden. Zwischen den untersuchten Lokalisationen und/oder dem Entnahmezeitpunkt können keine eindeutigen Abweichungen aufgezeigt werden.

Metalloproteinasen (MMP-2) und deren Gewebeinhibitoren (TIMP-1 und -2) können in der Placenta materna der Kontrolltiere immunhistologisch nicht nachgewiesen werden.

Mittels immunhistologischer Methoden ist in den Nuclei der maternalen Stromazellen innerhalb der gesamten Karunkel sowohl zum Zeitpunkt der Geburt als auch post partum eine sehr geringgradige Expression von Östrogenrezeptoren (IRS 0-0,1) (Anhang 9.4, Abb. 9.5A, S. XIII) und eine geringgradige Expression von Progesteronrezeptoren (IRS 1,4) (Anhang 9.4, Abb. 9.6A, S. XIII) darstellbar, wohingegen die Gefäßendothelzellen keinen der untersuchten Hormonrezeptoren exprimieren.

Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Placenta materna matura sind in Tab. 4.3, Seite 35 zusammengefasst.



#### 4.2.3.2 Placenta fetalis matura

Die Chorionepithelzellen im Bereich der maternalen Kryptenlumina exprimieren, unabhängig vom Entnahmezeitpunkt, intrazytoplasmatisch gering- bis mittelgradig MMP-2 (80% der Zellen) (Anhang 9.4, Abb. 9.7A, S. XV) und mittelgradig TIMP-2 (90% der Zellen) (Anhang 9.4, Abb. 9.3A, S. XI). Die fetale epitheliale Basallamina stellt sich kontinuierlich positiv für Kollagen Typ-IV und Laminin dar.

Die fetalen Stromazellen zeigen zu beiden Entnahmezeitpunkten keine Expression von Vimentin,  $\alpha$ -Aktin und/oder Desmin, dagegen ist das Stroma extrazellulär deutlich und gleichmäßig positiv für Kollagen Typ-I und Kollagen Typ-III.

Soweit beurteilbar, zeigen sowohl die Kapillaren als auch die größeren Gefäße der fetalen Plazenta eine der Placenta materna (Kapitel 4.2.3.1, S. 32) entsprechende Expression von Vimentin,  $\alpha$ -Aktin und Desmin, ebenso stellt sich die gefäßassoziierte Basallamina kontinuierlich Kollagen Typ-IV- und Laminin-positiv dar.

In der Tunica media größerer fetaler Gefäße sind Kollagen Typ-III-positive Fasern nachweisbar, die Tunica adventitia enthält vorwiegend Fasern vom Kollagen Typ-I (Probe A und B).

Zum Zeitpunkt der Geburt exprimieren 90% der Diplokaryozyten intrazytoplasmatisch hochgradig TIMP-2 (Anhang 9.4, Abb. 9.3A, S. XI), 50% mittelgradig Laminin (Anhang 9.4, Abb. 9.3A (Inset), S. XI) und 30% gering- bis mittelgradig TIMP-1 (Anhang 9.4, Abb. 9.8A, S. XV).

Im intraluminal nachweisbaren Chorionepithel (IRS 0,8) sowie in den Diplokaryozyten (IRS 0,1-0,5) kann nur in Probe A eine schwache intranukleäre Expression von Östrogenrezeptoren dargestellt werden (Anhang 9.4, Abb. 9.5A, S. XIII). Sowohl im fetalen Stroma als auch im Bereich der Gefäßendothelzellen werden keine Hormonrezeptoren exprimiert.

Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Placenta fetalis matura sind in Tab. 4.3, Seite 35 zusammengefasst.

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Befunde der Tiere aus Gruppe I

Die „Kontrolltiere“ der Gruppe I zeichnen sich durch eine *morphologische Reife* der untersuchten placentaren Strukturen, wie die Desintegration und Reduktion des maternalen Kryptenepithels und das stromale Ödem, aus. Intra partum noch sichtbare Anteile des Allantochorions können in der zweiten Probe nicht mehr dargestellt werden.

Enzymhistochemisch verläuft der lichtmikroskopische Nachweis sehr vereinzelter neutrophiler Granulozyten zum Zeitpunkt der Geburt sowie einiger neutrophiler Granulozyten 24 Stunden post partum positiv.

**Tab. 4.3:** Zusammenfassung der wichtigsten **immunhistologischen Befunde** an einer **Placenta materna et fetalis matura** zum Zeitpunkt der Geburt (Gruppe I; n=5)

Gewebe/Struktur	Kompartiment	Verteilung	immunhistologischer Nachweis/Marker
<b>Epithel</b>	fetal	IZ	80% MMP2+; 90% TIMP2++
		IN	PR-; ER+ (IRS 0,8)
<b>epitheliale Basallamina</b>	maternal/fetal	EZ	Koll IV+++; Lam+++ (kontinuierlich)
<b>Stroma</b>	maternal	IZ	90% V+++; 70% A++; 80% D++; 40% Lam+
		EZ	Koll I+++ (peripher) Koll I+++/III+++ (stielnah)
		IN	PR+ (IRS 1,4); ER(+) (IRS 0-0,1)
<b>gefäßassoziiertes Stroma</b>	fetal/maternal	IZ	90% V+++ / A+++ / D+++
		EZ	Koll I++; Koll III++ (peripher/stielnah)
<b>endotheliale Basallamina</b>	fetal/maternal	EZ	Koll IV+++ / Lam+++ (kontinuierlich)
<b>Diplokaryozyten</b>	fetal	IZ	30% TIMP1+; 90% TIMP2+++ ; 50% Lam++
		IN	PR-; ER+ (IRS 0,1-0, 5)

Legende zu Tab. 4.3:

IRS: immunreaktiver Score  
V: Vimentin  
A:  $\alpha$ -Aktin  
D: Desmin  
Koll: Kollagen Typ  
Lam: Laminin  
ER: Östrogenrezeptor  
PR: Progesteronrezeptor

-: negativ  
(+): angedeutet  
+: geringgradig  
++: mittelgradig  
+++: hochgradig  
IZ: intrazytoplasmatisch  
IN: intranukleär  
EZ: extrazellulär

Immunhistologisch zeigt das maternale Stroma eine kontinuierliche Expression von Vimentin,  $\alpha$ -Aktin und Desmin mit einem Anteil von etwa 80% Desmin exprimierender Zellen in der Karunkelbasis. Die maternale und fetale epitheliale Basallamina ist kontinuierlich positiv für Kollagen Typ-IV und Laminin, das Chorionepithel exprimiert intrazytoplasmatisch deutlich MMP-2, die einzeln erkennbaren Diplokaryozyten intrazytoplasmatisch schwach TIMP-1. Des Weiteren ist eine sehr geringgradige Östrogen- und eine geringgradige Progesteronrezeptorexpression im Zellkern der maternalen Stromazellen nachweisbar.

Zwischen den beiden Entnahmezeitpunkten können in dieser Gruppe keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden.

#### **4.3 Befunde bei Kühen mit experimentell verkürzter Gestationsdauer, Schnittentbindung und Vorliegen einer Retentio secundinarum (Versuchsgruppe II; n=31)**

##### **4.3.1 Lichtmikroskopische Befunde**

Bei den Proben der Versuchsgruppe II von 31 Kühen mit experimentell verkürzter Gestationsdauer, per Sectio caesarea entwickelten Kälbern und klinisch diagnostizierter Retentio secundinarum (Anhang 9.4, Abb. 9.1B, S. IX) können mittels der H.-E.-Färbung bei 23 Tieren die morphologischen Charakteristika *unreifer Plazentome* und daneben bei acht Tieren, *morphologisch unvollständig ausgereifte Plazentome*, definiert werden (siehe auch Kapitel 3.4, Tab. 3.2, Seite 23).

Im Folgenden werden die beiden Untergruppen II *unreif* (Placenta immatura) und II *unvollständig ausgereift* (Placenta matura retardata) getrennt voneinander beschrieben.

##### **4.3.1.1 Unreife Plazentome**

Im Folgenden wird die *plazentare Unreife* anhand einzelner Strukturelemente der Placenta materna und fetalis immatura für die Proben A und B dargestellt.

Die Festlegung der *morphologischen Unreife* der plazentaren Strukturen dieser Teilgruppe II beruht auf Abweichungen von den zugrunde liegenden Ergebnissen der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1, S. 28).

##### **4.3.1.1.1 Placenta materna immatura**

Die Kryptenlumina der Karunkeln zeichnen sich sowohl zum Zeitpunkt der Geburt als auch 24 Stunden post partum durch eine kontinuierliche, isoprismatische bis kubische Epithelauskleidung, mit vorwiegend zentral lokalisierten, runden bis ovoiden, heterochromatinreichen Zellkernen in einem mäßig eosinophilen und schaumigen Zytoplasma aus (Anhang 9.4, Abb. 9.2B, S. IX).

Zu keinem der beiden Entnahmezeitpunkte lassen sich deutliche Hinweise auf das in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.1, S. 29) nachgewiesene stromale Ödem des Karunkelstiels und/oder der peripheren Karunkelsepten feststellen. Das Stroma stellt sich metabolisch inaktiv, überwiegend in Form lang gestreckter, schlanker, zytoplasmaarmer Zellen mit flachen bis längsovalen, heterochromatinrei-

chen Zellkernen, dar (Anhang 9.4, Abb. 9.2B, S. IX). Eine hyaline Verquellung der extrazellulären Matrix ist nicht zu erkennen.

Die Kapillaren der peripheren Karunkelsepten sind in beiden Proben lediglich schwach hyperämisch. Im Unterschied zu den weitgehend kollabierten Venen in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.1, S. 29) erscheinen hier die großen Gefäße des Karunkelstiels zu beiden Entnahmezeitpunkten deutlich dilatiert mit einer mittel- bis hochgradigen Hyperämie. Intravasale Thromben sind nicht nachweisbar.

Neutrophile Granulozyten können in den Proben A und B nur ganz vereinzelt im Stroma und im Kryptenlumen nachgewiesen werden.

Die basalen Bereiche der Karunkeln sowie der feto-maternale Spaltraum zeigen multifokal gering- bis mittelgradige frische Blutungen.

Die wichtigsten morphologischen Befunde der Placenta materna immatura sind in Tab. 4.4, bzw. in Abb. 4.2A, Seite 39 zusammengefasst.

**Tab. 4.4:** Zusammenfassung der wichtigsten **morphologischen Befunde** an einer **Placenta materna immatura** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

Placenta materna immatura					
Gruppe II (n=23)	Kryptenepithel	neutrophile Granulozyten	Ödem	Hyperämie	hyaline Thromben
Probe A	+++	(+)	-	++/+++	-
Probe B	+++	(+)	-	++/+++	-

Legende zu Tab. 4.4:

-: nicht nachweisbar

(+): angedeutet/ganz vereinzelt

+: geringgradig/einzelne

++: mittelgradig

+++ : hochgradig/durchgehend

#### 4.3.1.1.2 Placenta fetalis immatura

Innerhalb der *morphologisch unreifen Plazentome* der Gruppe II treten die Chorionepithelzellen nahezu durchgehend in Form geschlossener, die Kryptenlumina vollständig ausfüllender Epithelzellverbände, häufig mit intensivem Kontakt zur maternalen Kryptenwand, auf (Anhang 9.4, Abb. 9.2B, S. IX). Kollabierte, „leer“ erscheinende Krypten, wie sie in der Kontrollgruppe angetroffen werden (Kapitel 4.2.1.2, S. 30), sind nicht zu sehen. Es handelt sich bei den Chorionepithelien um weitgehend intakte, große, anisomorphe, schwach eosinophile Zellen (mit großen, runden, euchromatinreichen Zellkernen), die nur sehr vereinzelt Anzeichen einer vakuolären Zelldegeneration zeigen. 24 Stunden nach der Geburt ist, verglichen mit der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.2, S. 30), der Anteil an strukturierten, zellulären Bestandteilen der Placenta fetalis deutlich erhöht und sichtbar gegen das maternale Kryptenepithel abgegrenzt, das heißt es ist weniger Zelldebris nachweisbar. Demzufolge

sind zu diesem Entnahmezeitpunkt kollabierte, „leere“ Krypten in den untersuchten Lokalisationen nicht zu finden.

Das Stroma der Tertiärzotten zeigt keine Anzeichen eines Ödems, die darin eingebetteten Kapillaren eine geringgradige Hyperämie.

Das Allantochorion kann in allen zum Zeitpunkt der Geburt entnommenen Proben als eine zusammenhängende, die Oberfläche der Karunkeln überspannende „Gewebehülle“ beobachtet werden (Anhang 9.4, Abb. 9.1B, S. IX). Dies entspricht morphologisch den bei zwei Tieren der Kontrollgruppe beschriebenen Befunden (Kapitel 4.2.1.2). In Probe B bleiben die Anteile dieses Allantochorions, im Unterschied zur Kontrollgruppe, stets sichtbar erhalten, das Verhältnis von intaktem Gewebe zu Zelldetritus variiert hier jedoch deutlich.

Die Anzahl der im Bereich der Kryptenlumina nachweisbaren Diplokaryozyten erscheint in dieser Gruppe, verglichen mit den anderen Gruppen, zu beiden Entnahmezeitpunkten am höchsten (Tab. 4.13, S. 51). Die Zellen sind zufällig innerhalb der geschlossenen Chorionepithelzellverbände lokalisiert, mit und ohne Kontakt zum maternalen Kryptenepithel. Es sind auch hier, wie in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.2, S. 30), einige „trinukleäre Riesenzellen“ erkennbar. Ihre Zellmorphologie entspricht den in der Kontrollgruppe aufgeführten Beschreibungen.

Die wichtigsten morphologischen Befunde der Placenta fetalis immatura sind in Tab. 4.5, bzw. in Abb. 4.2B, Seite 39 zusammengefasst.

**Tab. 4.5:** Zusammenfassung der wichtigsten **morphologischen Befunde** an einer **Placenta fetalis immatura** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

<b>Placenta fetalis immatura</b>						
<b>Gruppe II (n=23)</b>	<b>Chorion- epithel</b>	<b>Diplokaryo- zyten</b>	<b>neutrophile Granulozyten</b>	<b>Ödem</b>	<b>Hyperämie</b>	<b>hyaline Thromben</b>
<b>Probe A</b>	+++	+++	(+)	+	+	-
<b>Probe B</b>	+++	+++	(+)	+	+	-

Legende zu Tab. 4.5 siehe Legende zu Tab. 4.4, Seite 37.

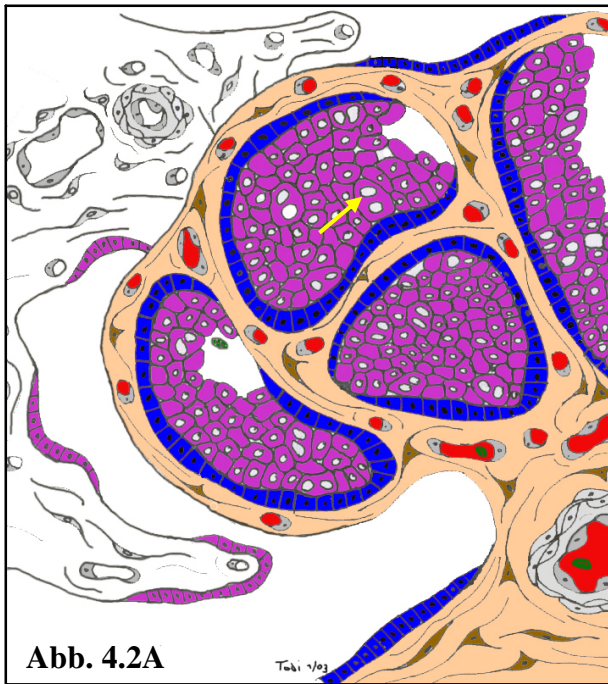


Abb. 4.2A

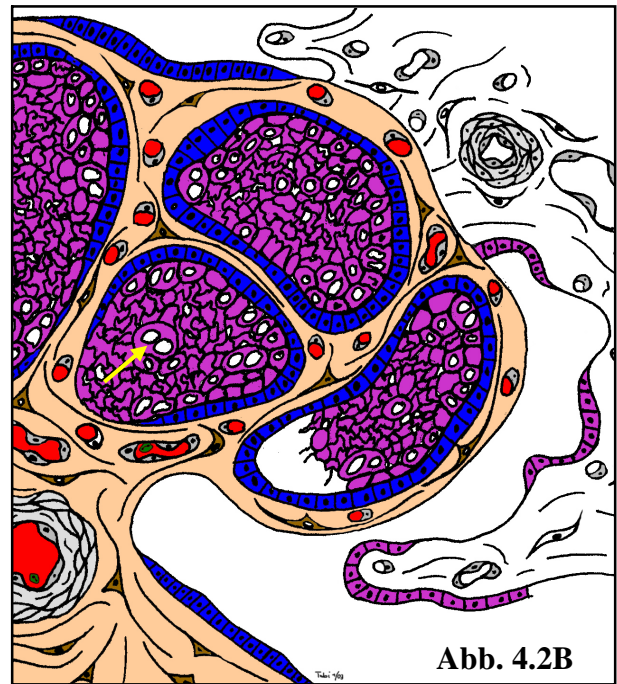


Abb. 4.2B

**Abb. 4.2A und B:** Schematische Darstellung der **morphologischen Befunde** an einer **Placenta materna et fetalis immatura** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (A) und 24 Stunden post partum (B)

Legende zu Abb. 4.2A und B:

	maternales Epithel		maternales Stroma
	fetales Epithel		Gefäße/Kapillaren
	fetales Stroma		neutrophile Granulozyten
Pfeil:	Diplokaryozyten		deutliche Hyperämie

#### 4.3.1.2 Unvollständig ausgereifte Plazentome

Neben den *morphologisch charakterisierten unreifen Plazentomen* der Gruppe II, können bei acht Tieren nach verkürzter Gestationsdauer und klinisch manifester Retentio secundinarum zum Zeitpunkt des Partus *morphologisch unvollständig ausgereifte Plazentome* (*Placenta materna et fetalis matura retardata*) dargestellt werden. Im Folgenden wird deren *plazentarer Reifegrad* anhand einzelner Strukturelemente der Placenta materna und fetalidis für die Proben A und B definiert (Siehe auch Kapitel 3.4, Tab. 3.2, Seite 23).

Der Grad *morphologischer Reife der plazentaren Strukturen* dieser Teilgruppe II wird an den zugrunde liegenden Ergebnissen der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1, S. 28) bemessen.

#### 4.3.1.2.1 Placenta materna matura retardata

Die Desintegration und numerische Reduktion des maternalen Kryptenepithels zum Zeitpunkt der Geburt ist hier vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.1, S. 29). Allerdings sind in Einzelfällen noch geringgradig vermehrt maternale, abgeflachte Epithelzellen oder -zellreihen mit schwach eosinophilem Zytoplasma und kleinen, rundlichen, heterochromatinreichen Nuclei im Bereich der Krypten nachweisbar. In der 24 Stunden später gewonnenen Probe können diese Zellen nur noch sehr vereinzelt dargestellt werden.

Das deutliche interstitielle Ödem, wie für die Kontrollgruppe beschrieben (Kapitel 4.2.1.1, S. 29), ist hier in Probe A lediglich im Karunkelstiel und nur geringgradig in Form metabolisch schwach aktiver Fibrozyten erkennbar. 24 Stunden post partum erscheint dieses Ödem in einzelnen Fällen mittelgradig ausgeprägt.

Zwischen den einzelnen Proben dieser Gruppe variiert der Grad der Hyperämie der peripheren Kapillaren und der größeren stielnahen Gefäße zu beiden Entnahmezeitpunkten von kollabierten Gefäßen bis hin zu einer hochgradigen Hyperämie.

Hinweise auf hyaline Gerinnungsthromben können in den untersuchten Lokalisationen zu beiden Entnahmezeitpunkten nicht gefunden werden.

In Übereinstimmung mit der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.1, S. 29) zeigt der Bereich des fetomaternalen Spaltraums sowie die Karunkelbasis multifokal gering- bis mittelgradig frische Blutungen. Die wichtigsten morphologischen Befunde der Placenta materna matura retardata sind in Tab. 4.6, bzw. in Abb. 4.3A, Seite 42 zusammengefasst.

**Tab. 4.6:** Zusammenfassung der wichtigsten **morphologischen Befunde** an einer **Placenta materna matura retardata** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

Placenta materna matura retardata					
Gruppe II (n=8)	Kryptenepithel	neutrophile Granulozyten	Ödem	Hyperämie	hyaline Thromben
Probe A	+	(+)	+	+ / +++	-
Probe B	+	(-)	+	+ / +++	-

Legende zu Tab. 4.6 siehe Legende zu Tab. 4.4, Seite 37.

#### 4.3.1.2.2 Placenta fetalis matura retardata

Die Chorionepithelzellen erscheinen in Probe A dieser Teilgruppe *unvollständig ausgereifter Plazentome* meist, vergleichbar mit den *unreifen Proben* dieser Gruppe (Kapitel 4.3.1.1.2, S. 37), als die Kryptenlumina füllende, geschlossene Zellverbände und nur zum Teil als freie Zellen oder Zellgrup-

pen. Dieses fetale Epithel stellt sich vorwiegend in Form intakter Zellen mit großen, runden bis pleomorphen, euchromatinreichen Nuclei dar, und nur in einem geringen Maße können eine vakuoläre Degeneration sowie einzelne Zellfragmente nachgewiesen werden. Kollabierte, „leere“ Krypten sind, im Unterschied zur Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.2, S. 30), nur sehr selten zu sehen.

Das Interstitium der fetalen Tertiärzotten weist häufiger als in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.2, S. 30) deutliche Anzeichen einer Hyperämie sowie eines interstitiellen Ödems auf.

24 Stunden post partum lässt sich fetales Gewebe im Bereich der Karunkelkrypten nahezu ausschließlich in Form von Zelldetritus nachweisen.

Es kommen in allen Proben dieser Gruppe zusammenhängende Anteile des Allantochorions vor, die hinsichtlich ihrer Morphologie keine deutlichen Unterschiede zur Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.2, S. 30) aufweisen. Im Gegensatz dazu bleiben 24 Stunden post operationem, in Übereinstimmung mit der klinischen Diagnose einer Retentio secundinarum (Kapitel 3.1, S. 21), diese Anteile des Allantochorions stets erhalten. Neben intaktem Gewebe liegen sie regelmäßig in Form von Zellfragmenten vor.

Große, mäßig zytoplasmareiche Diplokaryozyten werden in Probe A, wenn auch in etwas geringerer Anzahl als in den *unreifen Plazentomen* dieser Gruppe, regelmäßig und zahlreich (Tab. 4.13, S. 51), sowohl innerhalb geschlossener fetaler Epithelzellgruppen, als auch in Kontakt zur maternalen Kryptenwand angetroffen. Gelegentlich sind auch hier drei Zellkerne sichtbar. Unabhängig von der Anzahl, stellen sich diese als große, runde, heterochromatinreiche Nuclei dar. In Probe B nimmt die Anzahl der Diplokaryozyten, vergleichbar mit der Kontrollgruppe, ab (Tab. 4.13, S. 51).

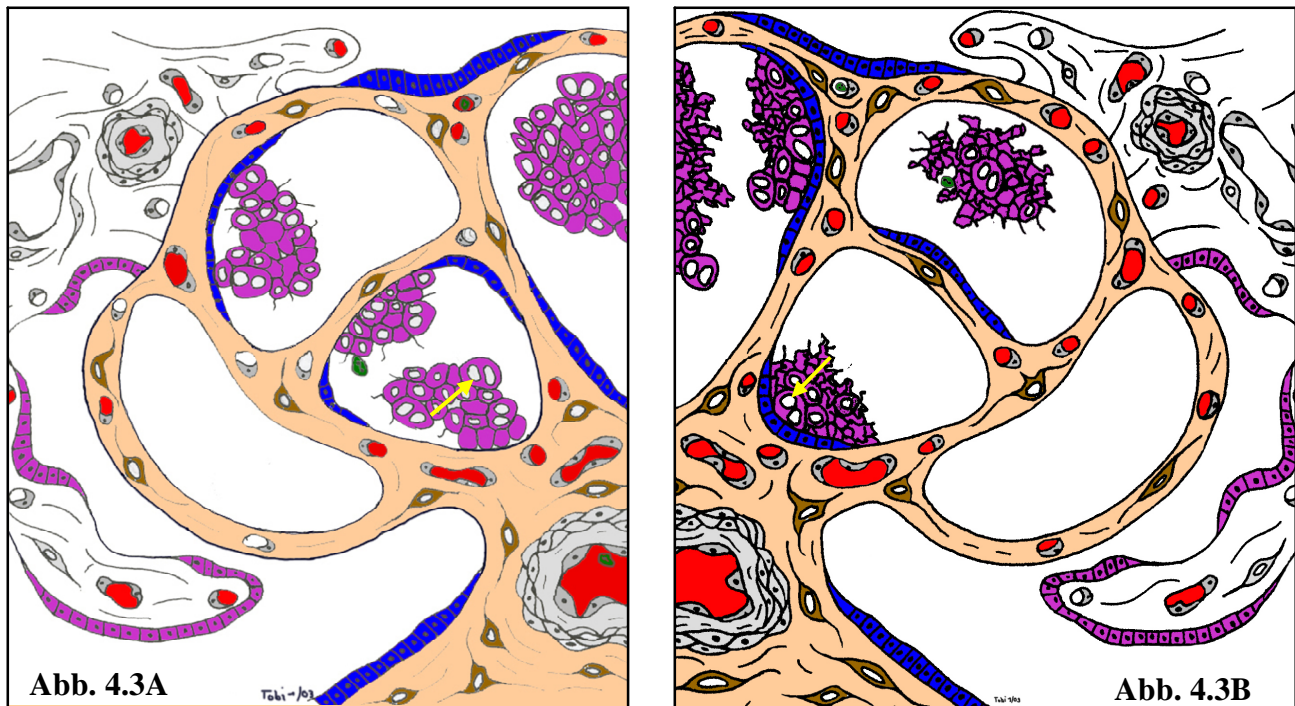
Die wichtigsten morphologischen Befunde der Placenta fetalis matura retardata sind in Tab. 4.7, bzw. in Abb. 4.3B, Seite 42 zusammengefasst.

**Tab. 4.7:** Zusammenfassung der wichtigsten **morphologischen Befunde** an einer **Placenta fetalis matura retardata** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

<b>Placenta fetalis matura retardata</b>						
<b>Gruppe II (n=8)</b>	<b>Chorion- epithel</b>	<b>Diplokaryo- zyten</b>	<b>neutrophile Granulozyten</b>	<b>Ödem</b>	<b>Hyperämie</b>	<b>hyaline Thromben</b>
<b>Probe A</b>	++	++	(+)	++	++	-
<b>Probe B</b>	++	++	(+)	++	++	-

Legende zu Tab. 4.7 siehe Legende zu Tab. 4.4, Seite 37.





**Abb. 4.3A und B:** Schematische Darstellung der **morphologischen Befunde** an einer **Placenta materna et fetalis matura retardata** zum Zeitpunkt der Geburt (A) und 24 Stunden post partum (B)

Legende zu Abb. 4.3A und B siehe Legende zu Abb. 4.2A und B, Seite 39.

#### 4.3.2 Enzymhistochemische Befunde

Im Rahmen der enzymhistochemischen Untersuchungen mittels CIAE von zwölf Tieren aus Gruppe II können keine deutlichen Unterschiede zwischen *morphologisch unreifen* und *unvollständig ausgereifen Plazentomen* gefunden werden. In den untersuchten Lokalisationen von sechs Proben jeder Teilgruppe lassen sich zum Zeitpunkt der Geburt sowohl im Bereich der Plazentombasis als auch in der Peripherie keine oder nur sehr vereinzelt neutrophile Granulozyten (0-2 Zellen/Gesichtsfeld/40er Objektiv) nachweisen.

Zum zweiten Entnahmezeitpunkt bleibt die Anzahl neutrophiler Granulozyten, abweichend von den Befunden innerhalb der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.2, S. 32), in allen untersuchten Lokalisationen annähernd gleich niedrig (0-4 Zellen/Gesichtsfeld/40er Objektiv). Lediglich in einem Fall können in der Plazentomperipherie zehn, bzw. 20 Zellen pro Gesichtsfeld nachgewiesen werden.

### 4.3.3 Immunhistologische Befunde

Die im Folgenden ausgeführten immunhistologischen Ergebnisse von zwölf Kühen der Gruppe II beziehen sich auf Abweichungen von der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3, S. 32).

Die immunhistologischen Befunde *unreifer*, bzw. *unvollständig ausgereifter Plazentome* werden getrennt voneinander beschrieben.

#### 4.3.3.1 Unreife Plazentome

Für die immunhistologische Befunderhebung innerhalb dieser Teilgruppe wurden sechs Tiere mit morphologisch deutlich *unreifen placentaren Strukturen* nach einer Gestationsdauer von 270 bis 274 Tagen ausgewählt und die immunhistologischen Befunde entsprechend der oben (Kapitel 4.3.1.1, S. 36) ausgeführten Morphologie der Placenta materna und fetalis immatura für die Proben A und B erarbeitet.

##### 4.3.3.1.1 Placenta materna immatura

Im Bereich des kontinuierlichen, isoprismatischen bis kubischen Kryptenepithels der Karunkeln ist sowohl zum Zeitpunkt der Geburt als auch 24 Stunden post partum weder MMP-2 noch einer der beiden Proteinase-Inhibitoren TIMP-1 oder TIMP-2 nachweisbar. Die epitheliale Basallamina lässt sich mit Hilfe von Kollagen Typ-IV und Laminin, zwischen den einzelnen Proben im Grad variierend, gar nicht bis schwach und diskontinuierlich darstellen (Anhang 9.4, Abb. 9.3B (Inset), S. XI).

Die Stromazellen der peripheren, verzweigten Septen und des Karunkelstiels sind hochgradig Vimentin- und mittelgradig  $\alpha$ -Aktin-positiv. Dagegen zeigen nur etwa die Hälfte dieser Zellen eine Expression von Desmin (Anhang 9.4, Abb. 9.4B, S. XI), also etwa 30% weniger Zellen als in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32). Mit der Kontrollgruppe übereinstimmend, exprimieren etwa 40% der Stromazellen zu beiden Entnahmezeitpunkten intrazytoplasmatisch geringgradig Laminin. Wie auch in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32), ist in der extrazellulären Matrix des maternalen Bindegewebes im Bereich der peripheren Karunkelsepten lediglich Kollagen Typ-I und in den stielnahen Bereichen Kollagen Typ-I und Typ-III nachweisbar.

Sowohl die Kapillaren als auch die größeren Gefäße des maternalen Stromas weisen in den Proben beider Entnahmezeitpunkte keine immunhistologischen Abweichungen zur Kontrollgruppe für Vimentin, Desmin,  $\alpha$ -Aktin, Kollagen Typ-I, Kollagen Typ-III, Kollagen Typ-IV, Laminin und MMP-2 auf (Kapitel 4.2.3.1, S. 32). Intra partum exprimieren in drei der sechs Proben etwa 50% der Medi-

amyozyten stielnaher Arterien intrazytoplasmatisch geringgradig TIMP-2.

Im Kryptenepithel lässt sich zur Geburt eine mäßig schwankende, gering- bis mittelgradige (IRS 2,2-4,3) (Anhang 9.4, Abb. 9.5B, S. XIII) und 24 Stunden später eine mittelgradige (IRS 3,5) Östrogenrezeptorexpression darstellen. Die Stromazellen exprimieren, im Unterschied zur Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32), gleichmäßig über die gesamte Karunkel verteilt, geringgradig Östrogenrezeptoren (IRS 0,3-1,0) und geringgradig Progesteronrezeptoren (IRS 1,9-2,3) (Anhang 9.4, Abb. 9.6B, S. XIII). Im Bereich der Gefäßendothelzellen sind die untersuchten Hormonrezeptoren nicht nachweisbar.

Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Placenta materna immatura der Gruppe II sind in Tab. 4.8 zusammengefasst.

**Tab. 4.8:** Zusammenfassung der wichtigsten **immunhistologischen Befunde** an einer **Placenta materna immatura** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Gruppe II; n=6)

Gewebe/Struktur	Verteilung	immunhistologischer Marker/Nachweis
<b>Epithel</b>	IN	PR-; <i>ER++ (IRS 2,2-4,3)</i>
<b>epitheliale Basallamina</b>	EZ	<i>Koll IV+/Lam+ (diskontinuierlich)</i>
<b>Stroma</b>	IZ	90% V+++; 90% A++; <b>50%D++</b> ; 40% Lam+
	EZ	Koll I+++ (peripher) Koll I+++/III+++ (stielnah)
	IN	<b>PR+ (IRS 1,9-2,3); ER+ (IRS 0,3-1)</b>
<b>gefäßassoziiertes Stroma</b>	IZ	90% V+++/A+++/D+++; <b>50%TIMP2+</b>
	EZ	Koll I+++/Koll III+++
<b>endotheliale Basallamina</b>	EZ	Koll IV+++/Lam+++ (kontinuierlich)

Legende zu Tab. 4.8 siehe Legende zu Tab. 4.3, Seite 35

„**Fett und kursiv hervorgehobene**“ Befunde zeigen deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe.

#### 4.3.3.1.2 Placenta fetalis immatura

Die geschlossenen Chorionepithelzellverbände innerhalb der *morphologisch unreifen Plazentome* der Gruppe II exprimieren lediglich intra partum zu etwa 30% intrazytoplasmatisch geringgradig MMP-2 (Anhang 9.4, Abb. 9.7B, S. XV), also deutlich weniger als in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.2). In Übereinstimmung mit der Kontrollgruppe ist peri und post partum intrazytoplasmatisch eine geringgradige TIMP-2-Expression in über 90% dieser fetalen Zellen nachweisbar (Anhang 9.4, Abb. 9.3B, S. XI).

Die Basallamina ist, im Unterschied zur Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.2, S. 34), zu beiden Untersuchungszeitpunkten mittels Kollagen Typ-IV und Laminin schwach und diskontinuierlich darstellbar. Das intrazytoplasmatische (Vimentin,  $\alpha$ -Aktin, Desmin) und extrazelluläre (Kollagen Typ-I, Kollagen Typ-III) Expressionsmuster im Bereich des fetalen Stromas entspricht den in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.2, S. 34) erhobenen Befunden.

In beiden Proben exprimieren die sehr zahlreich nachweisbaren Diplokaryozyten intrazytoplasmatisch zu 90% gering- bis mittelgradig TIMP-1 (Anhang 9.4, Abb. 9.8B, S. XV). Mindestens 90% dieser Zellen exprimieren ebenfalls intrazytoplasmatisch hochgradig TIMP-2 (Anhang 9.4, Abb. 9.3B, S. XI) und etwa 80% mittelgradig Laminin (Anhang 9.4, Abb. 9.3B (Inset), S. XI). Die auch in dieser Teilgruppe auftretenden fetalen „trinukleären Riesenzellen“ zeigen ein vergleichbares Expressionsmuster.

**Tab. 4.9:** Zusammenfassung der wichtigsten **immunhistologischen Befunde** einer **Placenta fetalis immatura** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Gruppe II; n=6)

Gewebe/Struktur	Verteilung	immunhistologischer Marker/Nachweis
<b>Epithel</b>	IZ	<b>30%MMP2+</b> ; 90%TIMP2+
	IN	PR-; <b>ER+</b> ( <i>IRS 0,2-1,6</i> )
<b>epitheliale Basallamina</b>	EZ	<b>Koll IV+/Lam+</b> ( <i>diskontinuierlich</i> )
<b>gefäßassoziiertes Stroma</b>	IZ	90%V+++/A+++/D+++
	EZ	Koll I++/Koll III++
<b>endotheliale Basallamina</b>	EZ	Koll IV+++/Lam+++ ( <i>kontinuierlich</i> )
<b>Diplokaryozyten</b>	IZ	<b>90%TIMP1++</b> ; 90%TIMP2+++; <b>80%Lam++</b>
	IN	PR-; <b>ER-</b>

Legende zu Tab. 4.9 siehe Legende zu Tab. 4.3, Seite 35

„**Fett und kursiv hervorgehobene**“ Befunde zeigen deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Im Bereich der fetalen Plazenta *unreifer Plazentome* lassen lediglich die intranukleären Östrogenrezeptoren des Chorionepithels Unterschiede zwischen beiden Entnahmezeitpunkten (immunreaktiver Score 0,2-1,6) erkennen (Anhang 9.4, Abb. 9.5B, S. XIII), im Gegensatz zu den gleich bleibend niedrigen Werten der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.2, S. 34). Ebenfalls von der Kontrollgruppe abweichend, ist eine Expression von Östrogenrezeptoren in den Zellkernen der Diplokaryozyten nicht nachweisbar. Mit der Kontrollgruppe übereinstimmend, exprimieren die Gefäßendothelzellen keine Hormonrezeptoren.

Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Placenta fetalis immatura aus Gruppe II sind in Tab. 4.9, Seite 45 zusammengefasst.

#### **4.3.3.2 Unvollständig ausgereifte Plazentome**

Für die immunhistologische Befunderhebung innerhalb dieser Teilgruppe wurden Proben von sechs Tieren mit *unvollständig ausgereiften plazentaren Strukturen* nach einer Gestationsdauer von 270 bis 275 Tagen ausgewählt und die immunhistologischen Befunde entsprechend der oben erläuterten Morphologie (Kapitel 4.3.1.2, S. 39) der Placenta materna und fetalis matura retardata für die Proben A und B erarbeitet.

##### **4.3.3.2.1 Placenta materna matura retardata**

Die in Probe A einzeln und in Probe B vereinzelt im Bereich der Krypten auftretenden maternalen Epithelzellen oder -zellreihen erlauben, wie auch in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32), keine aussagekräftige immunhistologische Beurteilung. Die epitheliale Basallamina ist, soweit nachweisbar, schwach und diskontinuierlich positiv für Kollagen Typ-IV und Laminin.

Im Bereich der peripheren Karunkelsepten sowie des geringgradig ödematisierten Karunkelstiels exprimieren die Stromazellen Vimentin,  $\alpha$ -Aktin, Desmin und Laminin, entsprechend den in der Kontrollgruppe erhobenen Befunden (Kapitel 4.2.3.1, S. 32).

Auch das extrazelluläre immunhistologische Reaktionsmuster des maternalen Stromas für Kollagen Typ-I und Kollagen Typ-III deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32).

Übereinstimmend mit den Untersuchungen der *unreifen Plazentome* dieser Gruppe (Kapitel 4.3.3.1.1, S. 43) kann eine intrazytoplasmatisch geringgradige TIMP-2-Expression der Mediamyozyten stielnaher Arterien dargestellt werden. Die übrigen immunhistologischen Untersuchungsbefunde im Bereich der Gefäße gleichen denen der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32).

Wie in der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32), sind Östrogenrezeptoren (IRS 0-0,8) und Progesteronrezeptoren (IRS 1,7-1,9) lediglich im maternalen Stroma, gleichmäßig verteilt, nachweisbar. Das Gefäßendothel zeigt auch hier keine Expression der Hormonrezeptoren.

Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen einer Placenta materna matura retardata der Gruppe II sind in Tab. 4.10 zusammengefasst.

**Tab. 4.10:** Zusammenfassung der wichtigsten **immunhistologischen Befunde** an einer **Placenta materna matura retardata** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Gruppe II; n=6)

Gewebe/Struktur	Verteilung	immunhistologischer Marker/Nachweis
<b>epitheliale Basallamina</b>	EZ	<b><i>Koll IV+/Lam.(+) (diskontinuierlich)</i></b>
<b>Stroma</b>	IZ	90% V+++/90% A++/ <b>80%D++</b> ; 40% Lam.+
	EZ	Koll I+++ (peripher) Koll I+++/III+++ (stielnah)
	IN	PR+ (IRS 1,7-1,9); ER(+) (IRS 0-0,8)
<b>gefäßassoziiertes Stroma</b>	IZ	90% V+++/A+++/D+++; <b>50%TIMP2+</b>
	EZ	Koll I+++/Koll III+++
<b>endotheliale Basallamina</b>	EZ	Koll IV+++/Lam+++ (kontinuierlich)

Legende zu Tab. 4.10 siehe Legende zu Tab. 4.3 ,Seite 35

„**Fett und kursiv hervorgehobene**“ Befunde zeigen deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe.

#### 4.3.3.2.2 Placenta fetalis matura retardata

Etwa 50% der Zellen innerhalb der Chorionepithelzellverbände im Bereich der Kryptenlumina exprimieren zu beiden Entnahmezeitpunkten intrazytoplasmatisch geringgradig MMP-2 und zu 90% intrazytoplasmatisch geringgradig TIMP-2. Die epitheliale Basallamina ist mittels Kollagen Typ-IV und Laminin schwach und diskontinuierlich darstellbar.

Der bindegewebige Grundstock fetaler Tertiärzotten sowie die Anteile des Allantochorions sind negativ für Vimentin,  $\alpha$ -Aktin und Desmin.

Dagegen können, wie auch in den anderen Gruppen, im fetalen Stroma intra und post partum, deutlich und gleichmäßig verteilt, kollagene Fasern sowohl vom Typ-I als auch vom Typ-III nachgewiesen werden.

Die Expression von Vimentin,  $\alpha$ -Aktin und Desmin sowie der extrazelluläre Nachweis der Strukturproteine Kollagen Typ-I, Typ-III, Typ-IV und Laminin im Bereich peripherer Kapillaren und stielnaher Gefäße entspricht den in der Kontrollgruppe erhobenen Befunden (Kapitel 4.2.3.2, S. 34). Die regelmäßig und zahlreich in den Kryptenlumina nachweisbaren mehrkernigen Riesenzellen (Diplokaryozyten) sind in beiden Proben etwa zur Hälfte intrazytoplasmatisch schwach positiv für TIMP-1. Zum Zeitpunkt der Geburt sind diese Zellen nahezu alle intrazytoplasmatisch hochgradig positiv für TIMP-2, 24 Stunden später sind es noch 60% mittelgradig positive Zellen. Außerdem zeigen die Diplokaryozyten, zwischen den Entnahmezeitpunkten von 40% bis 80% schwankend, intrazytoplasmatisch eine gering- bis mittelgradige positive Reaktion für Laminin.

Bei der immunhistologischen Darstellung der Steroidhormonrezeptoren kann in Probe A im Chorionepithel eine geringgradige (IRS 2,2) und in Probe B eine mittelgradige (IRS 3,3) Östrogenrezeptorexpression festgestellt werden. Die Diplokaryozyten zeigen zu beiden Entnahmezeitpunkten eine fehlende bis schwache Östrogenrezeptorexpression (IRS 0-0,5), die Gefäßendothelzellen keine Expression der untersuchten Hormonrezeptoren.

Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen einer Placenta fetalis matura retardata der Gruppe II sind in Tab. 4.11 zusammengefasst.

**Tab. 4.11:** Zusammenfassung der wichtigsten **immunhistologischen Befunde** an einer **Placenta fetalis matura retardata** zum Zeitpunkt der Sectio caesarea

Gewebe/Struktur	Verteilung	immunhistologischer Marker/Nachweis
<b>Epithel</b>	IZ	<b>50%MMP2+</b> ; 90%TIMP2++
	IN	PR-; <b>ER+ (IRS 2,2-3,3)</b>
<b>epitheliale Basallamina</b>	EZ	<b>Koll IV+/Lam(+)</b> ( <i>diskontinuierlich</i> )
<b>gefäßassoziertes Stroma</b>	IZ	90%V+++/A+++/D+++
	EZ	Koll I++/Koll III++
<b>endotheliale Basallamina</b>	EZ	Koll IV+++/Lam+++ (kontinuierlich)
<b>Diplokaryozyten</b>	IZ	<b>50%TIMP1++</b> ; <b>60-90%TIMP2+++</b> ; <b>40-80%Lam++</b>
	IN	PR-; ER(+) (IRS 0-0,5)

Legende zu Tab. 4.11 siehe Legende zu Tab. 4.3, Seite 35

„**Fett und kursiv hervorgehobene**“ Befunde zeigen deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe.

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Befunde der Tiere aus Gruppe II

23 von 31 Proben der Tiere mit experimentell verkürzter Gestationsdauer und Manifestation einer Retentio secundinarum nach Durchführung eines Kaiserschnittes weisen eine *morphologische Unreife der plazentaren Strukturen* in Form persistierender Kryptenepithelien, geschlossener Chorionepithelzellverbände, sehr zahlreicher Diplokaryozyten und fehlender stromaler Ödematisierung auf. Daneben können acht Tiere nachgewiesen werden, deren Plazentome nicht alle Kriterien *morphologischer Unreife* aufweisen, das heißt, diese acht Proben erfüllen lediglich einzelne Kriterien morphologischer Reife und werden daher als *noch nicht vollständig ausgereift* definiert.

In beiden Teilgruppen bleibt die zum Zeitpunkt des Kaiserschnittes geringe Anzahl neutrophiler Granulozyten auch 24 Stunden später auf einem vergleichbar niedrigen Niveau.

**Tab. 4.12:** Immunhistologische Befunde bei der plazentaren Unreife zum Zeitpunkt der Sectio caesarea (Placenta immatura (II<sup>1</sup>), Placenta matura retardata (II<sup>2</sup>))

Marker	Desmin		Laminin*/ Koll IV		MMP-2		TIMP-1		PR (IRS)		ER (IRS)	
Gruppe	II <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>	II <sup>1</sup>	II <sup>2</sup>
<b>Epithel mat.</b>	-	n.n.	-	n.n.	-	n.n.	-	n.n.	-	n.n.	++ 2,2- 4,3	n.n.
B.I.	-	-	disk. +	disk. +	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Stroma mat. stielnah</b>	50% ++	80% ++	40% +	40% +	-	-	-	-	++ 1,9- 2,3	++ 1,7- 1,9	++ 0,3- 1,0	(+) 0-0,8
<b>Epithel fetal</b>	-	-	-	-	30% +	50% +	-	-	-	-	++ 0,2- 1,6	++ 2,2- 3,3
B.I.	-	-	disk. +	disk. +	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diplok.</b>	-	-	80% ++*	80% ++*	-	-	90% ++	50% +	-	-	-	(+) 0-0,5

Legende zu Tab. 4.12 siehe auch Legende zu Tab. 4.3, Seite 35

<sup>1</sup> unreif

<sup>2</sup> unvollständig ausgereift

B.I.: Basallamina

disk: diskontinuierlich

mat.: maternal

Diplok.: Diplokaryozyten

\*Reaktion im Bereich der Diplokaryozyten gilt nur für **Laminin**

„**Fett und kursiv hervorgehobene**“ Befunde zeigen deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Die immunhistologischen Befunde bei den acht Tieren mit *unvollständig ausgereiften Plazentomen* entsprechen weitgehend denen der Kontrollgruppe, mit Ausnahme der schwach und diskontinuierlich Kollagen Typ-IV- und Laminin-positiven epithelialen Basallamina.

Immunhistologisch weisen die maternalen Anteile der *unreifen Plazentome* der Gruppe II, im Unterschied zur Kontrollgruppe, innerhalb des Kryptenepithels eine variabel gering- bis mittelgradige Östrogenrezeptorexpression, diskontinuierliche epitheliale Basallaminae sowie im Bereich des Stromas des Karunkelstiels eine geringere Desmin- und eine leicht erhöhte Progesteronrezeptorexpression auf.

Die Chorionepithelzellen der Placenta fetal immatura exprimieren lediglich geringgradig MMP-2, die sehr zahlreichen Diplokaryozyten annähernd durchgehend gering- bis mittelgradig TIMP-1. Dagegen werden Östrogenrezeptoren im Zellkern dieser Zellen nicht nachgewiesen.



Die wichtigsten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen einer Placenta immatura im Vergleich zu einer Placenta matura retardata sind in Tab. 4.12, Seite 49 zusammengefasst.

#### **4.4 Befunde bei Kühen mit physiologischer Gestationsdauer, klinisch notwendigen Geburtshilfemaßnahmen und Vorliegen einer Retentio secundinarum (Versuchsgruppe III; n=15)**

##### **4.4.1 Lichtmikroskopische Befunde**

In der Gruppe von Tieren mit klinischer Indikation für einen Kaiserschnitt (n=9), bzw. für eine konservative Geburtshilfe (n=6) weisen sieben Tiere klinisch eine Nachgeburtsverhaltung nach physiologischer Trächtigkeitsdauer auf. Davon zeigen fünf Tiere *reife*, ein Fall *unvollständig ausgereifte* (281. Gestationstag) und ein Tier *unreife placentare Strukturen* (276. Gestationstag) auf.

Im Folgenden werden Besonderheiten des *morphologischen Reifegrades* von Proben der Tiere aus Gruppe III mit Nachgeburtsverhaltung (n=7) anhand einzelner placentarer Strukturen der Placenta materna und fetalis für die Proben A und B beschrieben. Unterschiede zwischen Tieren mit Kaiserschnitt und konservativer Geburtshilfe können nicht gefunden werden.

##### **4.4.1.1 Placenta materna**

Die maternalen Anteile der *reifen Plazentome* der Kühe aus Gruppe III entsprechen in ihrer Morphologie den Befunden der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.1.1) mit einer Desintegration und numerischen Reduktion des Kryptenepithels, einer deutlichen stromalen Ödematisierung sowie einzelnen, gleichmäßig im Stroma verteilten neutrophilen Granulozyten, welche jedoch auch in der zweiten Probe in ihrer Anzahl nicht vermehrt erscheinen. Die Morphologie der *unreifen* sowie die der *unvollständig ausgereiften Plazentome* entspricht denjenigen Befunden aus Gruppe II (Kapitel 4.3.1.1, S. 36/Kapitel 4.3.1.2, S. 39).

##### **4.4.1.2 Placenta fetalis**

Abweichend von den im Kapitel 4.2.1.2, Seite 30 beschriebenen Befunden *reifer Plazentome* der Kontrolltiere, können bei entsprechenden Patienten der Gruppe III in Probe A häufiger geschlossene Chorionepithelzellverbände und eine leicht erhöhte Anzahl an Diplokaryozyten im Kryptenlumen angetroffen werden, in der zweiten Probe entspricht die Anzahl der Diplokaryozyten wieder den in der Kontrollgruppe ermittelten Werten (Tab. 4.13, S. 51). Die Befunde der *morphologisch unreifen*

sowie die *unvollständig ausgereiften Plazentome* dieser Gruppe entsprechen denjenigen Befunden aus Gruppe II (Kapitel 4.3.1.1, S. 36/Kapitel 4.3.1.2, S. 39).

**Tab. 4.13:** Gruppenvergleich hinsichtlich der **Anzahl an Diplokaryozyten** (Mittelwerte/Gesichtsfeld/40er Objektiv) zum Zeitpunkt der Geburt/Section caesarea (Probe A) und 24 Stunden post partum (Probe B)

Gruppe	I (n=5)	II <sup>1</sup> (n=6)	II <sup>2</sup> (n=6)	III (n=5)
Probe A	1	25	12	8
Probe B	0	17	1	0

Legende zu Tab. 4.13:

- I: *reife Plazentome* der Gruppe I (ungestörtes Puerperium)  
 II<sup>1</sup>: *unreife Plazentome* der Gruppe II (Retentio secundinarum)  
 II<sup>2</sup>: *unvollständig ausgereifte Plazentome* der Gruppe II (Retentio secundinarum)  
 III: *reife Plazentome* der Gruppe III (Retentio secundinarum)

#### 4.4.2 Enzymhistochemische Befunde

Für die enzymhistochemischen Untersuchungen der Proben aus Gruppe III wurden die sieben Tiere mit klinischer Diagnose einer Nachgeburtsverhaltung ausgewählt. Es lassen sich in allen Proben sowohl intra partum als auch post partum stielnah und peripher keine oder nur sehr vereinzelt neutrophile Granulozyten (0-5 Zellen/Gesichtsfeld/40er Objektiv) nachweisen.

#### 4.4.3 Immunhistologische Befunde

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden aus Gruppe III drei Tiere mit klinischer Indikation für einen Kaiserschnitt und zwei Tiere mit klinisch erforderlicher konservativer Geburtshilfe ausgewählt, die *morphologisch reife Plazentome* bei Vorliegen einer Retentio secundinarum aufweisen. Die immunhistologischen Befunde der einzelnen Strukturelemente wurden, wie in den anderen Gruppen, im Bereich der maternalen und fetalen Plazenta für die Proben A und B beurteilt.

Zwischen Tieren mit Kaiserschnitt, bzw. konservativer Geburtshilfe der Gruppe III können immunhistologisch keine deutlichen Unterschiede aufgezeigt werden.

##### 4.4.3.1 Placenta materna

Das maternale stielnahe Stroma weist, der Gruppe II *unreif* entsprechend (Kapitel 4.3.3.1.1, S. 43), eine geringere Desmin-Expression und eine höhere Progesteronrezeptorexpression auf, verglichen

mit der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.1, S. 32). Die weiteren immunhistologischen Befunde der einzelnen Strukturelemente entsprechen denen der Kontrollgruppe.

#### **4.4.3.2 Placenta fetalis**

Einzig von der Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.3.2, S. 34) abweichend, exprimiert die Placenta fetalis im Bereich des Chorionepithels MMP-2 intrazytoplasmatisch ähnlich schwach wie in den Proben der Gruppe II *unreif* (Kapitel 4.3.3.1.2, S. 44).

### **4.5 Vergleichende ultrastrukturelle Befunde (Gruppe I; n=2 und Gruppe II *unreif*; n=5)**

Die exemplarisch durchgeführten Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie dienen der Überprüfung der immunhistologischen Ergebnisse im Bereich der kollagenen Fasern der extrazellulären Matrix (Kapitel 4.2.3.1, S. 32 für Gruppe I; Kapitel 4.3.3.1.1, S. 43 für Gruppe II), inwieweit auf ultrastruktureller Ebene Veränderungen zwischen reifen (Gruppe I) und unreifen (Gruppe II) Plazentomen bezüglich der Fasertextur nachgewiesen werden können.

Im Rahmen dieser Untersuchungen können an einzelnen Stichproben *unreifer Plazentome* der Gruppe II (n=5), im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=2), im Bereich der kollagenen Fasern der Karunkelbasis zum Zeitpunkt der Geburt keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Fasertextur, -anordnung und/oder -querstreifung nachgewiesen werden. In beiden Gruppen können sowohl einheitlich homogene, reguläre Kollagenfibrillen als auch unscharf konturierte Fibrillen mit undeutlicher bis fehlender Querstreifung dargestellt werden.

### **4.6 Zusammenfassung der Befunde**

Alle untersuchten Plazentome der Gruppe II, sowohl die *morphologisch eindeutig unreifen* als auch die *unvollständig ausgereiften*, entwickeln ohne Ausnahme eine Nachgeburtsverhaltung, jedoch nur bei den erst genannten Probanden lassen sich mittels der durchgeführten Methoden eindeutige Abweichungen zur Kontrollgruppe darstellen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass bei Vorliegen einer Retentio secundinarum in Folge einer definiert verkürzten Gestationsdauer (Gruppe II), im Unterschied zu einer termingerechten Spontangeburt (Gruppe I), eine *morphologische Unreife* der Placenta materna et fetalıs bei der Mehrheit dieser Proben nachweisbar ist. Mittels der durchgeführten immunhistologischen und

enzymhistochemischen Untersuchungen konnte diese *morphologische Unreife* im Vergleich zur Kontrolle näher charakterisiert und darüber hinaus eine *funktionelle Unreife* einzelner plazentarer Strukturen aufgezeigt werden: So zeigen die geschlossenen Chorionepithelverbände eine höhere MMP-2-Expression, die sehr zahlreichen Diplokaryozyten eine höhere TIMP-1-Expression, das Kryptenepithel eine deutliche Östrogenrezeptorexpression sowie immunhistologisch diskontinuierliche Basallaminae, und im maternalen Stroma ist eine höhere Expression von Progesteronrezeptoren, aber eine geringere Desminexpression nachweisbar.

Interessanterweise treten in Gruppe II acht Tiere mit morphologisch nicht eindeutig *unreifen plazentaren Strukturen* auf, die eine Zwischenstellung zwischen der Kontrollgruppe und den *unreifen Plazentomproben* der Gruppe II einnehmen. Vor allem der *morphologisch-funktionelle Reifungsprozess* des fetalen Kompartiments erscheint bei diesen acht Tieren nicht abgeschlossen.

Ultrastrukturell können zwischen den Proben der Gruppen I und II anhand der durchgeführten Stichprobenuntersuchungen, bezogen auf das Stroma, keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden.

Bei den „Retentio-Patienten“ mit physiologischer Trächtigkeitsdauer aber klinisch notwendiger Geburtshilfe (konservativ oder Kaiserschnitt) (Gruppe III) können *morphologisch reife Plazentome* aufgezeigt werden, die gleichzeitig morphologisch-funktionelle Aspekte der Befunde sowohl aus der Kontrollgruppe als auch aus Gruppe II aufweisen. Diese Kühe der Gruppe III entwickeln also eine Retentio secundinarum trotz weitgehender *morphologischer Reife der plazentaren Strukturen*, die derjenigen der Kontrollgruppe entspricht. Die Plazentome zeigen lediglich einzelne immunhistologisch erfasste Abweichungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels morphologisch-funktioneller Studien an Plazentomproben von 83 Kühen nach definierter Gestationsdauer mit und ohne Ausbildung einer klinisch manifesten Retentio secundinarum nach unterschiedlichem Geburtsverlauf die geweblichen Vorgänge im Bereich der Placenta materna et fetalis zu untersuchen.

Als ein Beitrag zur Ätiopathogenese der bovinen Nachgeburtsverhaltung sollen mittels konventioneller Histologie und immunhistologischer Methoden der *morphologische Reifegrad der plazentaren Strukturen* der Tiere im peripartalen Zeitraum näher charakterisiert und darüber hinaus weiterführende, spezielle funktionelle Aspekte, unter anderem hinsichtlich proteolytischer Vorgänge im Ablösungsmechanismus der Secundinae, untersucht werden.

### 5.2 Kritische Beurteilung des Untersuchungsgutes und der Untersuchungsmethoden

Für eine eindeutige und zweifelsfreie Befundinterpretation wurden ausschließlich Plazentomproben von Kühen verwendet, die einer umfassenden klinischen und gynäkologischen Untersuchung unterzogen wurden, bevor die Gewebeproben in das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig zur Einsendung gelangten. Nur Proben der Tiere kamen in die Auswahl, bei denen vollständige Angaben bezüglich der Gestationsdauer sowie des Geburts- und Puerperalverlaufs gegeben waren.

Für den jeweils bekannten Gestations-/Geburtsstatus der Tiere aus Gruppe I und II wurden die entsprechenden Serum-Hormonwerte, den gängigen Literaturangaben entsprechend, als „normal“ vorausgesetzt und somit auf weiterführende endokrinologische Untersuchungen verzichtet.

An jeweils kleinen Gruppen des Untersuchungsgutes wurden neue immunhistologische Marker etabliert, (MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2) um diese Resultate mit denen bereits etablierter Marker zu vergleichen.

Diese immunhistologische Methodik erlaubt eine topographische Zuordnung und Quantifizierung einzelner Marker (MMPs/TIMPs), bezogen auf die einzelnen Strukturelemente. Im Falle erfolgversprechender Ergebnisse müssten diese durch weiterführende Untersuchungen zum einen anhand von Verlaufsuntersuchungen und zum anderen mittels qualitativer (Immunelektronenmikroskopie) und quantitativer (Zymographie) Methoden präzisiert werden.

In Hinblick auf zukünftige Arbeiten sollte, sowohl für morphologische als auch funktionelle Verlaufsuntersuchungen, neben dem bereits angesprochenen größeren Probenumfang, eine deutlich vor dem zu erwartenden Partus angesetzte Probenentnahme erfolgen. Hierfür wären Proben von Schlachttieren am besten geeignet, da eine in vivo Probengewinnung, welche den Versuchen dieser Arbeit zugrunde lag, bei tragenden Tieren nicht realisierbar ist.

Die Exstirpate wurden sofort nach der Entnahme in vierprozentigem Formalin fixiert, um eine optimale Voraussetzung für die Auswertung der eingesetzten immunhistologischen Marker (Kapitel 3.6, S. 24) zu gewährleisten. Für die exemplarisch durchgeführten ultrastrukturellen Untersuchungen (Kapitel 4.5, S. 52) erfolgte die Umfixierung der entsprechenden Proben in dreiprozentiger Glutaraldehydlösung zu einem späteren Zeitpunkt, wodurch eine eingeschränkte Beurteilbarkeit in Kauf genommen werden musste.

### **5.3 Morphologisch-funktionelle Aspekte zur *Placenta matura* nach termingerechter Spontangeburt und ungestörtem Puerperium**

Zum Zeitpunkt der termingerechten Spontangeburt und ungestörtem Puerperium durfte in den vorliegenden Untersuchungen von einem Partus-adäquaten Serum-Hormonstatus ausgegangen werden (WISCHRAL et al. 2001, TAKAGI et al. 2002), lichtmikroskopisch wurde eine *morphologische Reife* der plazentaren Strukturen nachgewiesen (Kapitel 4.2.1, S. 28). Gemeinsam mit den eigenen immunhistologischen Ergebnissen der bereits etablierten Marker ER, PR, Vimentin,  $\alpha$ -Aktin, Desmin und der untersuchten Kollagenfasern (Kapitel 4.2.3, S. 32) konnte das Bild einer *histomorphologisch reifen bovinen Plazenta* beschrieben werden, welche eine wichtige Voraussetzung, bzw. den Ausgangspunkt für einen ungestörten Abgang der Secundinae darstellt (WOICKE et al. 1986, SCHOON 1989).

Der Nachweis der MMPs und TIMPs in den Proben der Gruppe I kann als neuer Aspekt im physiologischen Ablösemechanismus der Nachgeburt angesehen werden, was auch WALTER u. BOOS (2001) im bovinen Plazentom immunhistologisch für MMP-2, MMP-9 und TIMP-2 postulieren. Auch wenn die immunhistologisch-topographischen Methoden dieser Arbeit keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Enzymaktivität der MMPs und TIMPs im plazentaren Stoffwechsel ermöglichen und somit eine definitive Aussage über deren mögliche Beteiligung an der Retentio secundinarum offen bleiben muss, erlauben die vorliegenden Ergebnisse dennoch folgende pathogenetischen Hypothesen (Abb. 5.1, S. 57):

Die nachgewiesene *morphologische Reife* der plazentaren Strukturen zum Zeitpunkt einer terminge-

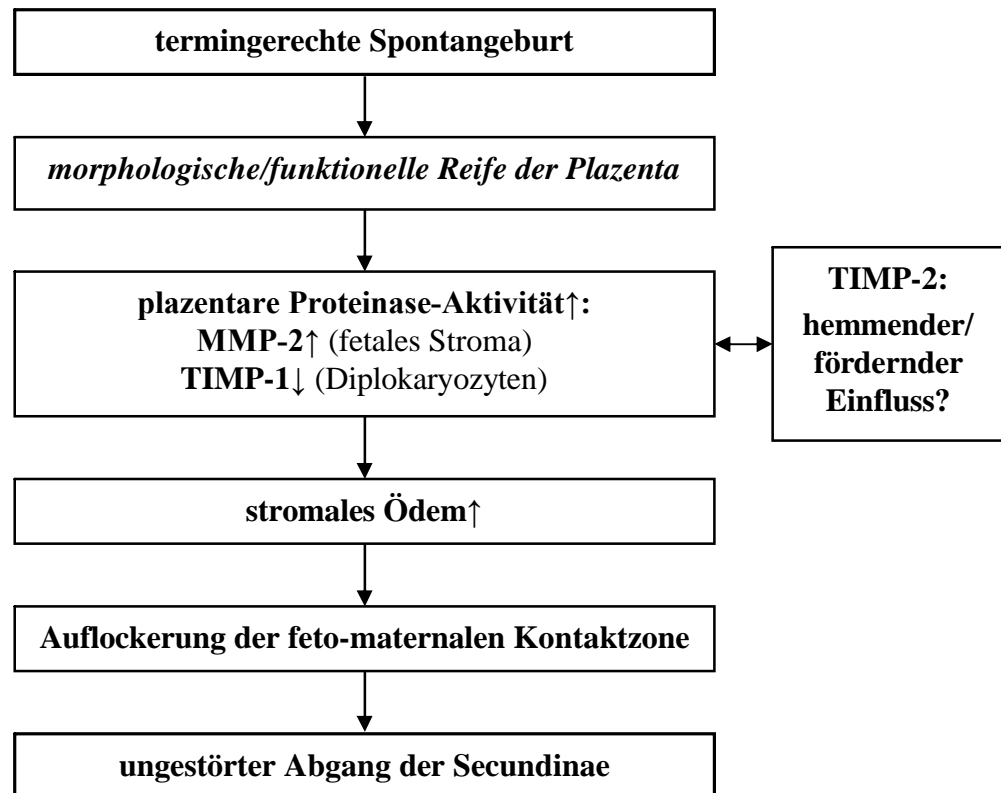
rechten Spontangeburt geht unter anderem mit einer *funktionellen Reife* im Sinne einer erhöhten Proteinase-Aktivität einher, erkennbar am deutlichen MMP-2-Nachweis (Placenta fetalis) sowie dem lediglich schwachen TIMP-1-Nachweis (Diplokaryozyten) (Kapitel 4.2.3.2, S. 34). Diese Proteinase-Aktivität könnte neben dem direkten Östrogen-Einfluss durch eine proteolytische Wirkung an Kollagenfasern an der Umstrukturierung und Ödematisierung des maternalen Stromas (Kapitel 4.2.1, S. 28) und somit an der Auflockerung im Bereich der feto-maternalen Kontaktzone beteiligt sein. Die bereits in früheren Arbeiten (SCHULZ u. MERKT 1956, WILLMS 1986, SCHOON 1989) morphologisch beschriebene Ödematisierung und Hyalinisierung des maternalen Stromas lässt sich somit möglicherweise auf diesem Wege interpretieren. Trotz nachgewiesener Proteinasen-Aktivität kann ein entsprechendes ultrastrukturelles Korrelat an den Kollagenfasern fehlen (LU et al. 2000).

Eine Beteiligung des in den Plazentomen der Kontrollgruppe nachgewiesenen TIMP-2 (Kapitel 4.2.3.2, S. 34) bei einem ungestörten Nachgeburtsabgang (Abb. 5.1, S. 57) kann kontrovers diskutiert werden:

In erster Linie deutet dieser Inhibitorennachweis auf einen hemmenden Einfluss gegenüber der oben vermuteten Proteinasen-Aktivität hin, wie dies auch HOWARD et al. (1991b) und FRIDMAN et al. (1993) in ihren Untersuchungen darlegen. Durch diesen hemmenden Einfluss von TIMP-2 würde der ungestörte Abgang der Secundinae behindert, somit stünde eine derartige TIMP-2-Wirkung im Widerspruch zur eigenen Hypothese des ungestörten Nachgeburtsabgangs (Abb. 5.1, S. 57).

Hingegen zeigen die Arbeiten von HERNANDEZ-BARRANTES et al. (2000, 2002) und ZHAO et al. (2004) an Zellkulturen, dass TIMP-2 über eine Interaktion mit weiteren membranständigen MMPs (so genannte MT-MMPs) die Aktivierung von MMP-2 an der Zelloberfläche fördert und somit die proteolytische Wirkung von MMP-2 nicht hemmt, sondern unterstützt. Diese Nachweise eines fördernden Einflusses von TIMP-2 auf MMP-2 bekräftigen die oben erarbeitete Hypothese (Abb. 5.1, S. 57).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass beispielsweise BERNARDO u. FRIDMAN (2003) im Rahmen ihrer in vitro-Studien lediglich einen regulativen Einfluss von TIMP-2 auf die MMP-2-Aktivität im Extrazellularraum vermuten können. Die tatsächliche Wirkung von TIMP-2 im interzellularen Proteolyse-Stoffwechsel bedarf demnach weiterer Untersuchungen.



**Abb. 5.1:** Hypothese zur Wirkung der plazentaren Proteinase-Aktivität auf den Nachgeburtsabgang nach termingerechter Spontangeburt

#### 5.4 Morphologisch-funktionelle Aspekte zur *Placenta immatura* nach vorzeitig eingeleiteter Geburt und Sectio caesarea sowie klinisch manifester Retentio secundinarum

Eine experimentelle Partusinduktion mittels Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  etwa zehn Tage vor dem physiologischen Geburtstermin, wie sie der Gruppe II zugrunde liegt (Kapitel 2.3.1, S. 7), geht mit einer endokrinologischen Partus-Asynchronizität einher, die hier nicht weiter untersucht, sondern nach gängiger Literatur (KORNMATITSUK et al. 2000, KINDAHL et al. 2002) als bekannt vorausgesetzt wird. Die zugrundeliegenden Veränderungen, im Sinne einer *morphologisch-funktionellen Unreife* der Plazenta, bilden den Ausgangspunkt für Puerperalstörungen wie eine Retentio secundinarum (SCHOON 1989, RASMUSSEN et al. 1996, WISCHRAL et al. 2001).

Die Mehrzahl der Plazentomproben aus Gruppe II zeigen, übereinstimmend mit der gängigen Literatur (BJÖRKMAN 1968, SCHOON 1989, BOOS et al. 2003a), lichtmikroskopisch eine *morphologische Unreife* innerhalb der plazentaren Kompartimente (Kapitel 4.3.1.1, S. 36), welche auch immunhistologisch darstellbar ist (Kapitel 4.3.3.1, S. 36):

So ist der zum Zeitpunkt der vorzeitig eingeleiteten Geburt Partus-inadäquate Hormonstatus in der eigenen Arbeit am ehesten erkennbar in den nachgewiesenen Imbalancen der Östrogen- und Pro-



gesteronrezeptorexpression; derartige Befunde bezüglich des immunhistologischen Hormonrezeptornachweises in der Plazenta von Kühen mit Retentio secundinarum werden auch von BOOS et al. (2000, 2005) beschrieben.

Weitere Hinweise auf eine *plazentare Unreife* sind in Form der verminderten myogenen Differenzierung des maternalen Stromas (geringere Desminexpression) sowie der mittels Laminin nachgewiesenen diskontinuierlichen epithelialen Basallamina zu erkennen und bestätigen die vorausgesetzte morphologisch-funktionelle Partus-Asynchronität als Ausgangspunkt für die Nachgeburtsverhaltung.

Das Vorhandensein von Mikrofilamenten ( $\alpha$ -Aktin) im Karunkelstroma entspricht den immunhistologischen Untersuchungen von WALTER u. BOOS (2001). Eine „myogene Weiterdifferenzierung“ dieses Stromas, bzw. die verminderte myogene Differenzierung bei Vorliegen einer Nachgeburtsverhaltung, entsprechend der vorliegenden Untersuchungsergebnisse, wurde bisher nicht beschrieben. Als neue Aspekte zur Manifestation einer Retentio secundinarum können die im Vergleich zur Kontrolle sehr zahlreich nachweisbaren TIMP-1 exprimierenden Diplokaryozyten sowie die geringere MMP-2-Expression der Placenta fetalis (Kapitel 4.3.3.1.2, S. 44) im Sinne einer *funktionellen plazentaren Unreife* interpretiert werden (Abb. 5.2, S. 60).

Diese *plazentare Unreife* geht mit einer erhöhten Inhibitoren-Aktivität des TIMP-1 einher, welche eine Hemmung der Proteinase-Aktivität von MMP-2 bewirkt. Eine reduzierte proteolytische Wirkung im Bereich der extrazellulären Matrix (kollagene Fasern) könnte am fehlenden stromalen Ödem (Kapitel 4.3.1.1.1, S. 36) sowie an der mangelnden Lockerung des feto-maternalen Kontakts beteiligt sein. Diese Befunde, zusammen mit weiteren möglichen Dysfunktionen des intrauterinen Enzymmetabolismus, tragen eventuell im Sinne einer mangelhaften Ablösung der Secundinae zur Manifestation der Retentio secundinarum bei. Zwar können WALTER u. BOOS (2001) im Rahmen ihrer immunhistologischen Untersuchungen (MMP-2 und -9 sowie TIMP-2) an Rinderplazentomen keine Unterschiede zwischen Tieren mit und ohne Nachgeburtsverhaltung feststellen, aber MAJ u. KANKOFER (1997) bestätigen mittels zymographischer Methoden eine reduzierte Proteinaseaktivität bei Kühen mit retinierten Fruchthüllen.

Weiterhin können aus der oben beschriebenen Hormonrezeptor-Imbalance durchaus Wechselbeziehungen zu Regelmechanismen, zum Beispiel den plazentaren Proteinase-/Inhibitorensystemen, resultieren (Abb. 5.2, S. 60), wie bei Versuchsmäusen für TIMP-1 und TIMP-3 nachgewiesen (NOTHNICK et al. 2004).

Aktuelle Studien zu alternativen MMP-Inhibitoren (ROSENBLUM et al. 2003, PUERTA et al. 2004) verdeutlichen, dass neben den „klassischen“ Proteinase und/oder Inhibitoren, welche auch der

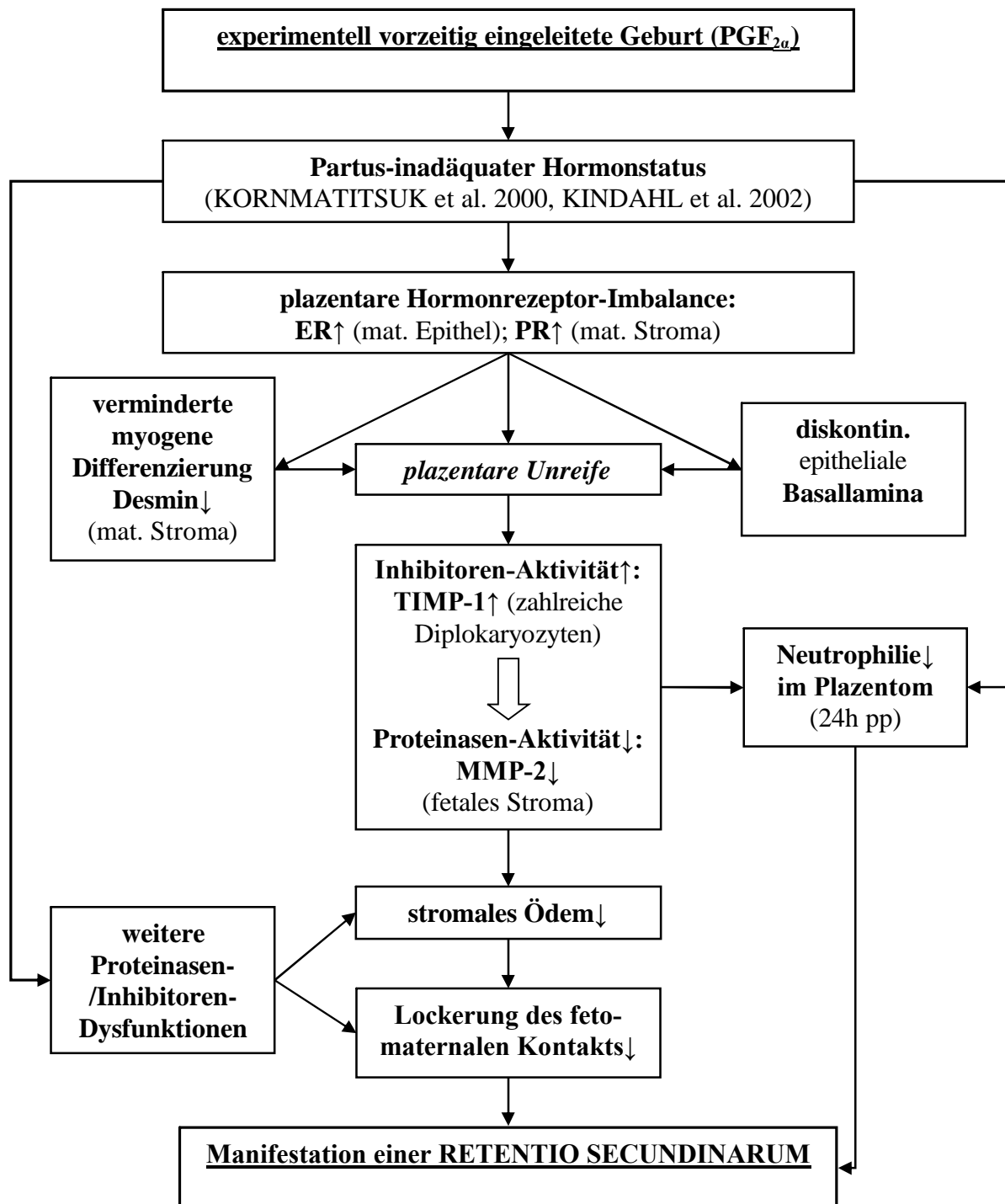
vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, weitere Lösungsansätze innerhalb der komplexen Zusammenhänge, wie sie in dem polyfaktoriellen Geschehen der Nachgeburtsverhaltung des Rindes vorliegen (SCHULZ u. GRUNERT 1959, GRUNERT 1985, SCHOON 1989, GRUNERT 1993c, SCHLAFFER et al. 2000, WIESNER 2003), berücksichtigt werden müssen.

Eine direkte Beteiligung proteolytischer Enzyme aus neutrophilen Granulozyten an den vermuteten Proteinase-Effekten im bovinen Plazentom, wie es für MMP-8 aus neutrophilen Granulozyten an bovinem Kollagen Typ-I beschrieben wurde (MARINI et al. 2000, GIOIA et al. 2002), ist unwahrscheinlich. Die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und somit deren mögliche Proteinase-Wirkung tritt in den untersuchten Proben erst 24 Stunden post partum auf (Kapitel 4.3.2, S. 42), also zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die Retentio secundinarum bereits manifestiert hat (HEUWIESER et al. 1986a, SCHOON 1989, SOBIRAJ 1992, GRUNERT 1993d).

HEUWIESER et al. (1986b) weisen auch auf eine verminderte chemotaktisch wirksame Gewebsaktivität, bezogen auf diese Zellen, im Plazentom hin und stellen zumindest einen indirekten Zusammenhang zum Auftreten einer Nachgeburtsverhaltung her.

Als Ursache für die ausbleibende Zellinfiltration kommt eine chemotaktische Dysfunktion in Frage, die in Verbindung mit der oben vermuteten mangelhaften Kollagenfaserfragmentierung stehen könnte. Zumindest bei der Ratte konnten Kollagenfaserfragmente als chemotaktische Faktoren der neutrophilen Granulozyten belegt werden (NAKAGAWA et al. 1999).

Die erhöhte plazentare Infiltration durch neutrophile Granulozyten bei ungestörter Spontangeburt steht unter anderem in Verbindung mit einem Anstieg des Serum-Östrogenspiegels (Östrogenplateau) (WESSENDORF et al. 1998). Demzufolge könnte ein zum Zeitpunkt des Kaiserschnittes Geburts-inadäquates Östrogenniveau, wie es für die vorliegende Arbeit, in Übereinstimmung mit der gängigen Literatur, eingangs aus der Verschiebung der Hormonrezeptorverteilung abgeleitet wurde, für die ausbleibende Infiltration der neutrophilen Granulozyten mitverantwortlich gemacht werden (Abb. 5.2, S. 60).



**Abb. 5.2:** Hypothese zur Manifestation einer Retentio secundinarum nach vorzeitig eingeleiteter Geburt und Sectio caesarea

Weitere Befunde im Bereich der *unreifen Plazentome* aus Gruppe II lassen Interpretationen im Sinne eines gestörten plazentaren Stoffaustausches zu:

Vor allem den zur Migration befähigten Diplokaryozyten (WOODING 1992) wird im diaplazentaren

Stoffwechsel des Rindes eine wichtige Bedeutung zugesprochen. Untersuchungen über die Stoffwechselleistungen der Diplokaryozyten im geburtsnahen Zeitraum beim Rind wurden in der Literaturübersicht (Kapitel 2.1.2, S. 2) beschrieben.

Das sehr zahlreiche Auftreten dieser Zellen vor dem physiologischen Geburtstermin (SCHLAFFER et al. 2000) konnte im eigenen Untersuchungsgut in den *unreifen Plazentomen* dargestellt werden. Die deutliche Verminderung der Anzahl an Diplokaryozyten zum physiologischen Geburtstermin (WILLIAMS et al. 1987, SCHOON 1989, SOBIRAJ 1992, WOODING 1992) konnte ebenfalls in der vorliegenden Untersuchung, vor allem bei den Tieren der Gruppe I, nachvollzogen werden.

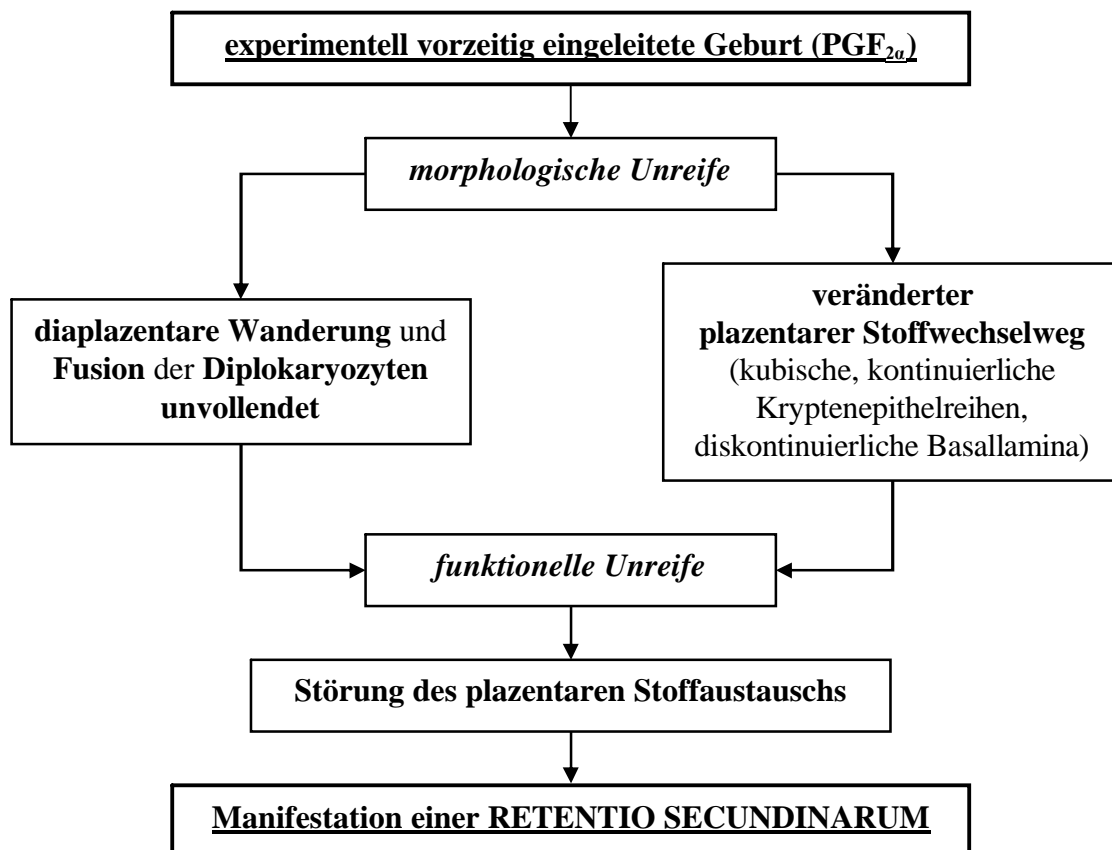
Die numerische Zellreduktion wird unter anderem auf die gerichtete Migration der Diplokaryozyten von der fetalen zur maternalen Seite der Plazenta und ihrer dortigen Verschmelzung mit maternalen Epithelzellen zurückgeführt (WOODING 1992, SCHLAFFER et al. 2000). Vergleichbare Befunde zur Zellzahlreduktion wurden von LEE et al. (1986) bei Wildwiederkäuern, beim Schaf (MERCER et al. 1989), bei der Ziege (WOODING et al. 1996) und auch bei Nagetieren (HOFFMAN u. WOODING 1993) dargelegt.

Vollzieht sich der Partus vor Abschluss der diaplazentaren Wanderungs- und Fusionsprozesse, wie bei den Tieren der Gruppe II, liegt der Schluss nahe, dass die Beteiligung der Diplokaryozyten am plazentaren Stoffaustausch unvollständig bleibt. Somit ist wiederum ein Teil der adäquaten Geburtsvorbereitung, als Voraussetzung für einen komplikationslosen Nachgeburtsabgang, nicht gewährleistet (Abb. 5.3, S. 62).

Der immunhistologische Nachweis einer Lamininexpression im Zytoplasma der Diplokaryozyten (Kapitel 4.3.3.1.2, S. 44) ist in der zur Verfügung stehenden Literatur bisher nicht beschrieben. Einige Autoren (MERCER et al. 1989, HOFFMAN u. WOODING 1993) sprechen dieser Zellpopulation in gewissem Maße phagozytotische Fähigkeiten zu. So erscheint es vorstellbar, dass es sich bei diesen intrazytoplasmatischen Reaktionsprodukten um Laminin-positiv reagierende, phagozytierte Komponenten der Basallamina handelt. Unter Berücksichtigung der oben angesprochenen Syntheseleistungen der Diplokaryozyten könnte es sich auch um Laminin-ähnliche, de novo synthetisierte Proteinstrukturen im Zytoplasma dieser Zellen handeln. Die tatsächliche Ursache dieses intrazytoplasmatischen Laminin-Nachweises bedarf weiterführender Untersuchungen.

Die immunhistologisch nachgewiesene Diskontinuität von Laminin in der maternalen und fetalen epithelialen Basallamina innerhalb der unreifen Plazentome der Tiere aus Gruppe II (Kapitel 4.3.3.1, S. 43) stellt einen weiteren, in dieser Form in der Literatur beim Rind noch nicht aufgeführten Befund dar: HAGER (1983) beschreibt sowohl im fetalen als auch im maternalen Kompartiment eine

breite epitheliale Basallamina, wie sie auch schon von BJÖRKMAN (1968) elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. SOBIRAJ (1992) stellt in seinen Untersuchungen an Rinderplazentomen fest, dass die subepitheliale Basallamina sowohl bei Tieren mit als auch ohne Nachgeburtshaltung lichtmikroskopisch stets sichtbar erhalten ist.



**Abb. 5.3:** Hypothese zur Bedeutung des plazentaren Stoffwechsels für die Manifestation einer Retentio secundinarum nach vorzeitig eingeleiteter Geburt

Eine Erklärung für die immunhistologische Diskontinuität von Laminin im Bereich der Basallamina in den eigenen Untersuchungen kann abschließend nicht gegeben werden. Im transzellulären Stoffaustausch zwischen fetalem und maternalem Kompartiment (NIKITENKO et al. 1998) stellt diese Diskontinuität der Basallamina, zusammen mit den noch vorhandenen geschlossenen Kryptenepithelreihen (Kapitel 4.3.1.1.1, S. 36), eine morphologisch-funktionelle Veränderung im diaplazentaren Stoffwechselweg dar: Physiologischerweise nimmt die fetale Plazenta nach Desintegration und numerischer Reduktion des maternalen Epithels direkten Kontakt mit der maternalen Basallamina auf („Placenta syndesmochorialis“, Kapitel 2.1.2, S. 2). Die beschriebene „pathologische“ Struktur die-

ses transzellularen Stoffwechselweges könnte durch eine abweichende Permeabilität eine weitere Störung des plazentaren Stoffaustauschs zur Folge haben (Abb. 5.3, S. 62).

### 5.5 Besonderheiten der *unvollständig ausgereiften Plazentome*

Bei den acht beschriebenen Tieren der Gruppe II mit *unvollständig ausgereiften plazentaren Strukturen* (Kapitel 4.3.1.2, S. 39) können im Unterschied zu den *unreifen Plazentomen* dieser Gruppe, trotz vorzeitig eingeleiteter Geburt und klinischer Diagnose einer Nachgeburtsverhaltung, vor allem im Bereich der Placenta materna, keine eindeutigen Hinweise auf eine *histomorphologische Unreife* gefunden werden (Kapitel 4.3.1.2.1, S. 40). Interessanterweise und in dieser Form in der Literatur nicht beschrieben, scheint sich die mangelhafte (unvollständige) *morphologische Ausreifung* bei diesen Proben vorwiegend auf das fetale Kompartiment in Form zahlreicher Diplokaryozyten und geschlossener Chorionepithelverbände zu beschränken. Dies kann als eine Divergenz im feto-maternalen Ausreifungsprozess innerhalb eines Plazentoms angesehen werden.

Mittels der durchgeführten Untersuchungen kann nicht abschließend beurteilt werden, in welcher Art und Weise diese Divergenz zwischen fetaler und maternaler Ausreifung eine Rolle bei der Retention der Secundinae gespielt hat. Es scheint aber vorstellbar, dass eine Ursache für die Manifestation der Retentio am ehesten im Bereich der *unreifen Placenta fetal*is, repräsentiert unter anderem durch die zahlreich nachweisbaren Diplokaryozyten zum Zeitpunkt des Partus, zu finden ist.

### 5.6 Betrachtungen zur Manifestation einer Retentio secundinarum nach termingerechter Spontangeburt

Interessanterweise können bei Tieren, die trotz physiologischer Gestationsdauer eine Retentio secundinarum aufweisen, mittels der durchgeführten Untersuchungsmethoden lediglich einzelne von der Kontrollgruppe abweichende Befunde (geringere MMP-2-Expression im Bereich der Placenta fetalis, geringere Desmin- sowie erhöhte Progesteronrezeptorexpression im maternalen Stroma) aufgezeigt werden (Kapitel 4.4.3, S. 51). Diese Unterschiede zu Tieren mit termingerechter Spontangeburt aber ungestörtem Abgang der Secundinae stellen Einzelhinweise auf eine inadäquate Geburtsvorbereitung dar, welche möglicherweise den Grundstein für die Manifestation der Nachgeburtsverhaltung mitgelegt haben.

Bei diesen klinischen Fällen einer Nachgeburtsverhaltung ist, im Unterschied zu Gruppe II (vorzeitige medikamentelle Geburtsinduktion), der Ausgangspunkt der Erkrankung nicht fassbar. Auch eine Wichtung der abweichenden Einzelbefunde in Bezug auf das Auftreten der Retentio secundinarum ist

nicht möglich. Dennoch kann jeder Einzelpunkt als schwerwiegend genug angesehen werden, die Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung mit zu beeinflussen, auch wenn die primäre Ursache der Erkrankung nicht bekannt ist.

Weitere mögliche Ursachen einer Nachgeburtsverhaltung, die mit den eigenen pathogenetischen Ansätzen/Hypothesen, vor allem in Bezug auf den Proteinase-Stoffwechsel, in Verbindung gebracht werden können, sind beispielsweise die Hemmung der MMP-9-Aktivität durch Stickstoffmonoxid (NO), bzw. eine beim Menschen beschriebene MMP-9-Induktion durch reaktive Sauerstoffspezies (GURJAR et al. 1999, 2001). Eine Abschwächung der MMP-9- und TIMP-1-Expression durch NO wird ebenfalls bei der Ratte beschrieben (EBERHARDT et al. 2000). Beim Rind ist der regulatorische Einfluss von NO auf MMP-13 bekannt (ZARAGOZA et al. 2002).

Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass Verteilung, Wirkung und Aktivität der MMPs und TIMPs von einem sehr breiten Spektrum an Enzymen, bzw. deren Reaktionsprodukten abhängt, welches über die zur Verfügung stehende Methodik der vorliegenden Arbeit hinausgeht und somit Anlass zu nachfolgenden Untersuchungen bietet. Auch weitere klinische Parameter, die nicht Eingang in die vorliegenden Untersuchungen gefunden haben, wie beispielsweise der peripartale Kalziumstoffwechsel hinsichtlich der Uteruskontraktilität, andere Ursachen einer Wehenschwäche oder der Einfluss äußerer Stressfaktoren auf den Geburtsverlauf, spielen in die potentielle Manifestation einer Retentio secundinarum mit hinein.

## 5.7 Abschließende Betrachtung

Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben weitere Teilaspekte im polyfaktoriellen Geschehen des Erkrankungskomplexes der Nachgeburtsverhaltung beim Rind. Die mittels der zur Verfügung stehenden Methodik an einer repräsentativen Auswahl des Tiergutes dargelegten morphologisch-funktionellen Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Kühen liefern neue Aspekte zur Ätiopathogenese der Retentio secundinarum.

Vor dem Hintergrund der Häufigkeit dieser Erkrankung beim Rind in der intensiven Nutztierhaltung (GRUNERT 1993d, LAVEN u. PETERS 1996, DRILLICH et al. 2003), bzw. der damit verbundenen gravierenden gesundheitlichen und reproduktionstechnischen Defizite, wie Endometritiden (LEWIS 1997, DOHMEN et al. 2000, TEFERA et al. 2001, RISCO u. HERNANDEZ 2003, KIM u. KANG 2003, HAN u. KIM 2005), reduzierte Milchleistung (RAJALA u. GROHN 1998) bis hin zu Sub- und/oder Infertilitäten (STEVENS u. DINSMORE 1997, TEFERA et al. 2001, HAN u. KIM 2005) erscheinen weitere Bemühungen zur Erforschung der Ätiopathogenese dieser Erkan-

kung mehr als gerechtfertigt.

Vor allem in der Charakterisierung der Enzymaktivität von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Gewebehinhibitoren sowie deren Zusammenspiel mit weiteren über- und untergeordneten hormonellen und/oder enzymatischen Regulationsmechanismen könnte ein Schwerpunkt weiterführender Untersuchungen liegen. Dafür erscheint die Kombination immunhistologischer (wie in der vorliegenden Arbeit) und zymographischer Methoden (MAJ u. KANKOFER 1997, IURLARO et al. 1999), die sogenannte *in situ* Zymographie, für die Erforschung weiterer Proteinase und Inhibitoren im proteolytischen Enzymstoffwechsel boviner Plazentome sinnvoll.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### **Plazentareifung beim Rind und Retentio secundinarum**

#### **-Morphologisch-funktionelle Untersuchungen-**

**Tobias Winter**

**Institut für Veterinär-Pathologie und Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik,  
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig**

**Eingereicht im April 2007**

(70 Seiten, 27 Abbildungen, 22 Tabellen, 184 Literaturangaben, 17 Seiten Anhang)

*Schlüsselworte: Retentio secundinarum, Rind, Plazentom, morphologisch-funktionelle Reife/Unreife*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die geweblichen Veränderungen im Bereich der bovinen Placenta materna et fetalıs von Kühen nach definierter Gestationsdauer und unterschiedlichem Geburtsverlauf mit und ohne klinisch manifester Nachgeburtsverhaltung zu dokumentieren und zu interpretieren.

Daher wurden Plazentomproben von 51 Kühen entnommen und entsprechend der anamnestisch-klinischen Daten der Tiere in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I beinhaltet Plazentome von fünf Tieren mit ungestörtem Abgang der Secundinae nach terminogerechter Spontangeburt. In Gruppe II wurden Proben von 31 Tieren mit Nachgeburtsverhaltung nach experimentell vorzeitig eingeleiteter Geburt (PGF<sub>2α</sub> und Schnittentbindung) und in Gruppe III Proben von 15 Patienten mit und ohne Nachgeburtsverhaltung nach physiologischer Trächtigkeitsdauer und konservativer Geburtshilfe zusammengefasst.

Die Plazentome wurden mittels konventioneller histologischer Verfahren (H.-E.-Färbung), enzym-histochemischer (CIAE) und immunhistologischer Techniken (Östrogen- und Progesteronrezeptoren, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, Vimentin, α-Aktin, Desmin, Kollagen Typ-I, Typ-III, Typ-IV, Laminin) sowie exemplarisch ultrastrukturell untersucht.

Der gängigen Literatur entsprechend, lassen sich mittels H.-E.-Färbung bei den Proben der Gruppe I eine *morphologische Reife* und in der Gruppe II mehrheitlich eine *Unreife* der untersuchten plazentaren Strukturen beschreiben. Daneben werden in Gruppe II bei acht Tieren nach vorzeitiger Geburtseinleitung und Auftreten einer Retentio secundinarum *unvollständig ausgereifte Plazentome* gefunden. Die Tiere der Gruppe III weisen, mit zwei Ausnahmen, entsprechend der Kontrollgruppe (Gruppe I), eine *morphologische Reife der Plazenta* auf.

Mittels CIAE wird ein Ausbleiben der plazentaren Infiltration neutrophiler Granulozyten bis 24 Stunden post partum bei Vorliegen einer Nachgeburtsverhaltung (Gruppe II und III) dokumentiert. Als Ausdruck ihrer *morphologischen Unreife* zeigen entsprechende Proben der Gruppe II, verglichen mit der Kontrollgruppe, immunhistologisch eine Imbalance der plazentaren Hormonrezeptorexpression, eine verminderte myogene Differenzierung des Stromas sowie eine mittels Lamininnachweis ermittelte diskontinuierliche epitheliale Basallamina. Als Folge dieser *morphologischen Unreife* in Gruppe II, wird die höhere Anzahl TIMP-1 exprimierender Diplokaryozyten, zusammen mit der geringeren MMP-2-Expression des Chorionepithels in Form einer plazentaren Proteinase-Hemmung als Störung des Nachgeburtsabgangs interpretiert. Die diskontinuierlich erscheinenden epithelialen Basallaminae innerhalb der *unreifen Plazentome* werden, zusammen mit den (noch) vorhandenen Kryptenepithelreihen, als eine Abweichung vom physiologischen (dia)plazentaren Stoffwechselweg interpretiert. Den sehr zahlreich nachweisbaren Diplokaryozyten wird, im Sinne einer unvollendeten Migration und Fusion, ebenfalls eine Beteiligung an diesen Stoffwechselstörungen zugeschrieben.

Bei den acht *morphologisch unvollständig ausgereiften Plazentomen* der Gruppe II ist der Ausreifungsprozess vorwiegend im fetalen Kompartiment noch nicht abgeschlossen. Bei diesen Tieren liegt die Ursache der Retentio secundinarum am ehesten in der *Unreife der Placenta fetalis* begründet. Bei den „spontanen Fällen“ einer Nachgeburtsverhaltung (Gruppe III) zeigen sich lediglich einzelne, variabel von der Kontrollgruppe abweichende immunhistologische Befunde, deren Wichtung in Bezug auf das Auftreten einer Nachgeburtsverhaltung abschließend nicht möglich erscheint.

Bei der immunhistologischen Charakterisierung des Verteilungsmusters kollagener Fasern im Bereich von Stroma und Gefäßen können zwischen den Proben der drei Gruppen keine Unterschiede festgestellt werden.

Die mittels der zur Verfügung stehenden Methodik dargelegten Ergebnisse, bzw. deren Diskussion speziell in Bezug auf den plazentaren Proteinase-Stoffwechsel in Relation zum plazentaren Steroidhormonrezeptorstatus stellen neue Interpretationsansätze im polyfaktoriellen Geschehen der Retentio secundinarum dar. Die eigenen Untersuchungen über den immunhistologischen Nachweis und die Verteilung einzelner Proteinasen und Inhibitoren im bovinen Plazentom wurden nach Etablierung der entsprechenden Nachweisverfahren durchgeführt und sollten durch weiterführende Untersuchungen eines größeren Tiergutes im klinischen Kontext ergänzt und erweitert werden.

## 7 SUMMARY

### **Placental maturation in the cow and placental retention**

#### **-morphologic-functional investigations-**

**Tobias Winter**

**Institute of Pathology and Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services,  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig**

Submitted in April 2007

(70 pages, 27 figures, 22 tables, 184 references, 17 pages appendices)

*Keywords: placental retention, cow, placentoma, morphologic-functional maturity/immaturity*

The aim of the study was to document and to interpret tissue changes in the bovine maternal and fetal placenta of cows with defined gestation periods but differing courses of labour with or without clinically apparent placental retention.

Samples of placentomas of 51 cows were taken and grouped into 3 different categories according to their clinical anamnestic data:

Group I includes the placentomas of five cows with undisturbed placental expulsion after spontaneous labour at term. Group II comprises of samples of 31 animals with placental retention following an experimentally preterm delivery (PGF<sub>2α</sub> and caesarean section) and group III of specimens of 15 patients with and without placental retention after a physiological gestation period and conservative obstetrics.

The placentomas were investigated using conventional histological methods (H.-E.-stain), enzyme histochemistry (CIAE) as well as immunohistochemical (estrogen- and progesterone receptor, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, vimentin,  $\alpha$ -actin, desmin, collagen type-I, type-III, type-IV, laminin) and exemplarily ultrastructural techniques.

According to current literature, the placental structures in H.-E.-stained slides showed morphological maturity in group I and morphological immaturity in most patients of group II. Furthermore, incomplete maturation of the placentomas was found in eight animals of group II with preterm induction of labour and placental retention. Except of two animals, group III exhibited morphological placental maturation corresponding to the findings in the control group (group I).

Using CIAE an absence of placental infiltration with neutrophils until 24 hours post partum in cases of placental retention (group II and III) was documented. The morphological immaturity of the corresponding samples of group II in comparison to the control group is expressed in the immunohis-

tological imbalance of the placental hormone receptor expression, the reduced stromal myogenic differentiation ( $\alpha$ -actin) as well as the discontinuity of the epithelial basement membrane (laminin). Resulting from the visible morphological immaturity in group II, the increased number of TIMP-I expressing diplocaryocytes in connection with the reduced MMP-2 expression of the chorionic epithelium is interpreted as an interruption of the placental abruption via an inhibition of the placental proteinases. The discontinuity of the epithelial basement membranes within the immature placentomas in conjunction with the (still) visible epithelial rows in the crypts are taken as an aberrance of the physiological (dia-) placental metabolism. In addition to that, a participation in the disturbed metabolism is attributed to the numerous diplocaryocytes in terms of an unfinished migration and fusion. In the morphologically incomplete matured placentomas in eight animals of group II, predominantly the maturation of the fetal compartment is not terminated. Therefore, the reason for the placental retention is most probably based on the immaturity of the fetal placenta. In comparison to the control group, the “spontaneous cases” of placental retention (group III) solely show few variably differing immunohistochemical patterns. A weighting of the immunohistochemical findings in these animals in relation to placental retention appears impossible.

The immunohistochemical characterization of the distribution of collagen fibres in the stroma and the vessels showed no differences between either group.

The results of the present study using the methods described above and the discussion of the findings especially with respect to the placental metabolism of proteinases in relation to the placental hormone receptor status represent new approaches of interpretation in the multifactorial event of placental retention. Following the establishment of the corresponding immunohistochemical markers, the presence and the distribution of different proteinases and inhibitors in the bovine placenta was investigated. Nevertheless, in order to fully understand this very complex mechanism of metabolic disturbances, further investigations with the help of a larger quantity of animals and considering the clinical context should supplement and extend the findings of the present study.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Aimes RT, Quigley JP. Matrix Metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem.* 1995;270:5872-6.

Al-Sadi HI, Majeed AF, Ridha AM. Histopathology of retained bovine fetal membranes. *Theriogenology.* 1994;42:273-8.

Arbeiter K. Retentio secundinarum beim Pferd. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe.* 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993. p. 401-3.

Atkinson BA, King GJ, Amoroso EC. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod.* 1984;30:763-74.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115:3719-27.

Beckett S, Lean I, Dyson R, Tranter W, Wade L. Effects of monensin on the reproduction, health, and milk production of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1998;81:1563-73.

Bedini AS. Leonardo Forscher, Künstler, Magier. 2nd ed. Berlin: Bassermann; 2005.

Berchthold M, Rüsch P. Geburtsstörungen durch Eihäute und Nabelstrang. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe.* 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993a. p. 245-8.

Berchthold M, Rüsch P. Geburtsstörungen seitens des Muttertieres. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe.* 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993b. p. 222-45.

Bernardo MM, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J.* 2003;374:739-45.

Birgel EHJr, Zerbe H, Grunert E. Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen. *D Prakt Tierarzt.* 1996;7:627-30.

Björkman NH. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *J Ultrastr Res.* 1968;24:249-58.

Blanchard TL, Varner DD. Therapy for retained placenta in the mare. *Vet Med.* 1993;88:55-9.

Boos A. Immunohistochemical assessment of collagen types I, III, IV and VI in biopsy samples of the bovine uterine wall collected during the oestrous cycle. *Cells Tissues Organs.* 2000;167:225-38.

Boos A, Janssen V, Mulling C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction.* 2003a;126:469-80.

- Boos A, Kohtes J, Janssen V, Mulling C, Stelljes A, Zerbe H et al. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. *Anim Reprod Sci.* 2005.
- Boos A, Kohtes J, Stelljes A, Zerbe H, Thole HH. Immunohistochemical assessment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth with or without retention of fetal membranes. *J Reprod Fertil.* 2000;120:351-60.
- Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 1996;44:11-21.
- Boos A, Stelljes A, Kohtes J. Collagen types I, III and IV in the placentome and interplacentomal maternal and fetal tissues in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Cells Tissues Organs.* 2003b;174:170-83.
- Breeveld-Dwarkasing VN, Struijk PC, Lotgering FK, Eijskoot F, Kindahl H, van der Weijden GC et al. Cervical dilatation related to uterine electromyographic activity and endocrinological changes during prostaglandin F(2alpha)-induced parturition in cows. *Biol Reprod.* 2003;68:536-42.
- Budipitojo T, Matsuzaki S, Cruzana MBC, Baltazar ET, Hond E, Sunaryo S et al. Immunolocalization of gastrin-releasing peptide in the bovine uterus and placenta. *J Vet Med Sci.* 2001;63:11-5.
- Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res.* 1994;55:934-43.
- Chakraborti S, Mandal A, Das S, Chakraborti T. Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger by peroxynitrite in microsomes of pulmonary smooth muscle: role of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Acta.* 2004;1671:70-8.
- Chassagne M, Barnouin J, Chacornac JP. Predictive markers in the late gestation period for retained placenta in black-pied dairy cows under field conditions in France. *Theriogenology.* 1998;49:645-56.
- Curry TE, Jr., Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod.* 2001;64:1285-96.
- Davies CJ, Fisher PJ, Schlafer DH. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. *Placenta.* 2000;21:194-202.
- Davies CJ, Hill JR, Edwards JL, Schrick FN, Fisher PJ, Eldridge JA et al. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:267-80.
- Dlamini BJ, Li Y, Anderson LL. Mifepristone (RU 486) induces parturition in primiparous beef heifers and reduces incidence of dystocia. *J Anim Sci.* 1995;73:3421-6.
- Dohmen MJ, Joop K, Sturk A, Bols PE, Lohuis JA. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology.* 2000;54:1019-32.

- Dosogne H, Burvenich C, Lohuis JA. Acyloxyacyl hydrolase activity of neutrophil leukocytes in normal early postpartum dairy cows and in cows with retained placenta. *Theriogenology*. 1999;51:867-74.
- Drillich M, Pfutzner A, Sabin HJ, Sabin M, Heuwieser W. Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle. *Theriogenology*. 2003;59:951-60.
- Duello TM, Byatt JC, Bremel RD. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*. 1986;119:1351-5.
- Duffield T, Bagg R, DesCoteaux L, Bouchard E, Brodeur M, DuTremblay D et al. Prepartum mornensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*. 2002;85:397-405.
- Duncan ME, Richardson JP, Murray GI, Melvin WT, Fothergill JE. Human matrix metalloproteinase-9: activation by limited trypsin treatment and generation of monoclonal antibodies specific for the activated form. *Eur J Biochem*. 1998;258:37-43.
- Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Bohles H et al. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int*. 2000;57:59-69.
- Fridman R, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Komarek D, Liang CM et al. Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J*. 1993;289 ( Pt 2):411-6.
- Furstenberg A, Busch W, Furstenberg L, Munchow H. Studies Into Etiology of Placental Retention in Cattle. *Monatsh Veterinarmed*. 1990;45:493-6.
- Gilbert RO, Grohn YT, Guard CL, Surman V, Neilsen N, Slauson DO. Impaired post partum neutrophil function in cows which retain fetal membranes. *Res Vet Sci*. 1993;55:15-9.
- Gioia M, Fasciglione GF, Marini S, D'Alessio S, De SG, Diekmann O et al. Modulation of the catalytic activity of neutrophil collagenase MMP-8 on bovine collagen I. Role of the activation cleavage and of the hemopexin-like domain. *J Biol Chem*. 2002;277:23123-30.
- Gross TS, Williams WF, Manspeaker JE, Lewis GS, Russek-Cohen E. Bovine placental prostaglandin synthesis in vitro as it relates to placental separation. *Prostaglandins*. 1987;34:903-17.
- Gross TS, Williams WF, Russek-Cohen E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta*. 1991;12:27-35.
- Grosser O. Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen. Wien: Verlag Braumüller; 1909.
- Grunert E. Geburtsstörungen seitens des Fruchte. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe*. 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993a. p. 248-80.
- Grunert E. Zurückbleiben der Nachgeburt. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe*. 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993d. p. 390-401.

- Grunert E. Etiology, Pathogenesis and Therapy of Retained Bovine Placenta. *Wien Tierarztl Mschr.* 1983;70:230-5.
- Grunert E. Problems of Polyfactorial Diseases - Retention of Afterbirth As A Model. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1985;127:689-705.
- Grunert E. Retentio secundinarum bei Schaf und Ziege. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe.* 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993b. p. 403.
- Grunert E. Störungen der Nachwehen und des Abgangs der Nachgeburt. In: Grunert E, Arbeiter K, editors. *Tiergeburtshilfe.* 4th ed. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1993c. p. 381-6.
- Grunert E, Ahlers D, Heuwieser W. The Role of Endogenous Estrogens in the Maturation Process of the Bovine Placenta. *Theriogenology.* 1989;31:1081-91.
- Gunnink JW. Retained placenta and leucocytic activity. *Vet Q.* 1984b;6:49-51.
- Gunnink JW. Pre-partum leucocytic activity and retained placenta. *Vet Q.* 1984a;6:52-4.
- Gurjar MV, DeLeon J, Sharma RV, Bhalla RC. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol.* 2001;91:1380-6.
- Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2871-7.
- Hager G. Morphology of the Bovine Placenta. *Wien Tierarztl Mschr.* 1983;70:217-22.
- Han IK, Kim IH. Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. *J Vet Sci.* 2005;6:53-9.
- Hashizume K, Takahashi T, Shimizu M, Todoroki J, Shimada A, Hirata M et al. Matrix-metalloproteinases-2 and -9 production in bovine endometrial cell culture. *J Reprod Dev.* 2003;49:45-53.
- Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol.* 2002;12:131-8.
- Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, Sang QA, Fridman R. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:126-30.
- Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y et al. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2000;275:12080-9.
- Heuwieser W, Kautni J, Biesel M, Grunert E. Coagulation profile of dairy cattle in the periparturient period. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1990a;37:8-15.



- Heuwieser W, Kautni J, Grunert E. Coagulation profile in different stages of pregnancy and under consideration of placental expulsion in dairy cattle. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1990b;37:310-5.
- Heuwieser W, Offeney F, Hartig U, Grunert E. [The duration of afterbirth expulsion in cattle]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1986a;93:467-9.
- Heuwieser W, Woicke J, Grunert E, Ehlert R. [Significance of chemotactic activity and leukocyte infiltration of placental tissue for the expulsion of the fetal membranes in cattle]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1986b;99:127-30.
- Hirschberger J. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus Liebig Univ., Fachber. Veterinärmed.; 1987.
- Hoffman LH, Wooding FB. Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J Exp Zool*. 1993;266:559-77.
- Hoffmann B. Gravidität, Geburt und Puerperium. In: Döcke F, editor. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3rd ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena; 1994. p. 509-941.
- Holm LW, Salvatore C, Zeek-Minning P. The histology of the postterm bovine placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 1964;88:479-89.
- Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem*. 1991b;266:13064-9.
- Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem*. 1991a;266:13070-5.
- Hurskainen T, Hoyhtya M, Tuuttila A, Oikarinen A, utio-Harmainen H. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 1996;44:1379-88.
- Imai K, Khandoker MA, Yonai M, Takahashi T, Sato T, Ito A et al. Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in bovine follicular fluid of different-sized follicles: relationship to intra-follicular inhibin and steroid concentrations. *Domest Anim Endocrinol*. 2003;24:171-83.
- Inaba T, Inoue A, Shimizu R, Nakano Y, Mori J. Plasma concentrations of progesterone, estrogens, vitamin A and beta-carotene in cows retaining fetal membranes. *Nippon Juigaku Zasshi*. 1986;48:505-8.
- Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M et al. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to post-partum reproductive diseases. *J Vet Med Sci*. 2004;66:1403-8.
- Itoh Y, Ito A, Iwata K, Tanzawa K, Mori Y, Nagase H. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *J Biol Chem*. 1998;273:24360-7.

- Iurlaro M, Loverro G, Vacca A, Cormio G, Ribatti D, Minischetti M et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:793-801.
- Joosten I, Hensen EJ. Retained placenta: an immunological approach. *Anim Reprod Sci.* 1992;28:451-61.
- Joosten I, Sanders MF, Hensen EJ. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. *Anim Genet.* 1991;22:455-63.
- Kaidi R, Brown PJ, David JS, Etherington DJ, Robins SP. Uterine collagen during pregnancy in cattle. *Vet Res.* 1995;26:87-91.
- Kangasniemi A. Zum Verlauf der Geburtsvorbereitung, der Geburt und des Puerperiums der Stute: Klinische und endokrinologische Untersuchungen [Dissertation med. vet]. Berlin, Freie Universität: Fachber. Veterinärmed.; 1995.
- Kankofer M. Protein peroxidation processes in bovine retained and not-retained placenta. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001b;48:207-12.
- Kankofer M. The levels of lipid peroxidation products in bovine retained and not retained placenta. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001c;64:33-6.
- Kankofer M. Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase. *Placenta.* 2001a;22:466-72.
- Kankofer M, Guz L. Is poly(ADP-ribose) polymerase involved in bovine placental retention? *Domest Anim Endocrinol.* 2003;25:61-7.
- Kankofer M, Guz L, Wiercinski J. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase in bovine retained and not retained placenta. *Reprod Domest Anim.* 2004;39:39-42.
- Kankofer M, Schmerold I. Spontaneous oxidative DNA damage in bovine retained and nonretained placental membranes. *Theriogenology.* 2002;57:1929-38.
- Kankofer M, Wiercinski J, Zerbe H. Prostaglandin E(2) 9-keto reductase activity in bovine retained and not retained placenta. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66:413-7.
- Kask K, Gustafsson H, Gunnarsson A, Kindahl H. Induction of parturition with prostaglandin f2 alpha as a possible model to study impaired reproductive performance in the dairy cow. *Anim Reprod Sci.* 2000;59:129-39.
- Katila T, Huhtinen M, Järvinen T, Reilas T, Maisi P. gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in uterine fluid of post partum mares. *Pferdeheilkunde.* 2001;17:691-2.
- Kemp B, Soede NM, Kankofer M, Bevers M, Taverne MA, Wensing T et al. Influence of linoleic/linolenic acid ratio in the diet of periparturient cattle on plasma concentrations of PGF2 alpha metabolite and placental expulsion rate. *Theriogenology.* 1998;49:571-80.

- Kim IH, Kang HG. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. *J Reprod Dev* 2003;49:485-91.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli ME, Jr., Reinhardt TA. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2002;85:544-50.
- Kindahl H, Kornmatitsuk B, Gustafsson H. The cow in endocrine focus before and after calving. *Reprod Domest Anim.* 2004;39:217-21.
- Kindahl H, Kornmatitsuk B, Königsson K, Gustafsson H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;23:321-8.
- Klisch K, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat Embryol. (Berl)* 1999;200:229-37.
- Königsson K, Gustafsson H, Gunnarsson A, Kindahl H. Clinical and bacteriological aspects on the use of oxytetracycline and flunixin in primiparous cows with induced retained placenta and post-partal endometritis. *Reprod Domest Anim.* 2001;36:247-56.
- Königsson K, Gustafsson H, Kindahl H. 15-Ketodihydro-PGF(2 alpha), progesterone and uterine involution in primiparous cows with induced retained placenta and post-partal endometritis treated with oxytetracycline and flunixin. *Reprod Domest Anim.* 2002;37:43-51.
- Kornmatitsuk B, Königsson K, Kindahl H, Gustafsson H, Forsberg M, Madej A. Clinical signs and hormonal changes in dairy heifers after induction of parturition with prostaglandin F2 alpha. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2000;47:395-409.
- Laven RA, Peters AR. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet Rec.* 1996;139:465-71.
- Laven RA, Peters AR. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. *Reprod Domest Anim.* 2001;36:289-96.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, TenHag J, Walton JS et al. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 2002;85:1416-26.
- LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *J Dairy Sci.* 2004;87:609-19.
- Lee CS, Gogolin-Ewens K, Brandon MR. Comparative studies on the distribution of binucleate cells in the placentae of the deer and cow using the monoclonal antibody, SBU-3. *J Anat.* 1986;147:163-79.
- Leiser R, Kaufmann P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol.* 1994;102:122-34.
- Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci.* 1997;80:984-94.

- Liebich HG. Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina). In: Liebich HG, editor. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4th ed. Stuttgart und New York: Schattauer; 2004. p. 293-310.
- Lijnen HR, Soloway P, Collen D. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. *Circ Res*. 1999;85:1186-91.
- Lotthammer KH. [Comparative studies of the course of mineral, metabolite, enzyme and hormone levels in blood serum ante partum in dairy cows with and without later retained placenta]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1983;90:427-33.
- Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol*. 2003;40:382-94.
- Lu L, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Ursell PC, Nissen T, Galaray RE et al. Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H601-H609.
- MacIntyre DM, Lim HC, Ryan K, Kimmins S, Small JA, MacLaren LA. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biol Reprod*. 2002;66:1430-6.
- Maj JG, Kankofer M. Activity of 72-kDa and 92-kDa matrix metalloproteinases in placental tissues of cows with and without retained fetal membranes. *Placenta*. 1997;18:683-7.
- Marini S, Fasciglione GF, De SG, D'Alessio S, Politi V, Coletta M. Cleavage of bovine collagen I by neutrophil collagenase MMP-8. Effect of pH on the catalytic properties as compared to synthetic substrates. *J Biol Chem*. 2000;275:18657-63.
- Matamoros RA, Caamano L, Lamb SV, Reimers TJ. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biol Reprod*. 1994;51:486-92.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990;6:121-5.
- Mercer WR, Gogolin-Ewens KJ, Lee CS, Brandon MR. Localization and purification of SBU-4--a pregnancy specific protein of the ovine uterus. *Placenta*. 1989;10:71-82.
- Michal JJ, Heirman LR, Wong TS, Chew BP, Frigg M, Volker L. Modulatory effects of dietary beta-carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 1994;77:1408-21.
- Milosavljevic M, Duello TM, Schuler LA. In situ localization of two prolactin-related messenger ribonucleic acids to binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*. 1989;125:883-9.
- Miyoshi M, Sawamukai Y, Iwanaga T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. *Reprod Domest Anim*. 2002;37:53-6.

- Musah AI, Schwabe C, Willham RL, Anderson LL. Induction of parturition, progesterone secretion, and delivery of placenta in beef heifers given relaxin with cloprostenol or dexamethasone. *Biol Reprod.* 1987;37:797-803.
- Myers DA, Reimers TJ. Purification and endocrine evaluation of bovine binucleate trophoblastic cells. *Methods Cell Sci.* 1988;11:83-8.
- Nakagawa H, Takano K, Kuzumaki H. A 16-kDa fragment of collagen type XIV is a novel neutrophil chemotactic factor purified from rat granulation tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256:642-5.
- Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hashizume K. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. *Cell Tissue Res.* 2001;303:263-70.
- Nikitenko L, Morgan G, Kolesnikov SI, Wooding FB. Immunocytochemical and In situ hybridization studies of the distribution of calbindin D9k in the bovine placenta throughout pregnancy. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:679-88.
- Nikkari ST, Hoyhtya M, Isola J, Nikkari T. Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol.* 1996;149:1427-33.
- Nothnick WB, Zhang X, Zhou HE. Steroidal regulation of uterine edema and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-3 messenger RNA expression is altered in TIMP-1-deficient mice. *Biol Reprod.* 2004;70:500-8.
- Özgen S, Rasch K, Kropp G, Schoon H-A, Aupperle H, Sieme H et al. Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromucometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde.* 1997;13:533-4.
- Peter AT, Bosu WTK. Peripartal Endocrine Changes Associated with Retained Placenta in Dairy Cows. *Theriogenology.* 1987;28:383-94.
- Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E, Volders L et al. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest.* 1994;71:838-46.
- Puerta DT, Lewis JA, Cohen SM. New beginnings for matrix metalloproteinase inhibitors: identification of high-affinity zinc-binding groups. *J Am Chem Soc.* 2004;126:8388-9.
- Rajala PJ, Grohn YT. Effects of dystocia, retained placenta, and metritis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1998;81:3172-81.
- Rasmussen FE, Wiltbank MC, Christensen JO, Grummer RR. Effects of fenprostalene and estradiol-17 beta benzoate on parturition and retained placenta in dairy cows and heifers. *J Dairy Sci.* 1996;79:227-34.
- Raulo SM, Sorsa T, Tervahartiala T, Pirila E, Maisi P. MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD horses. *Equine Vet J.* 2001;33:128-36.

- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17:208-12.
- Risco CA, Hernandez J. Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. *The-riogenology.* 2003;60:47-58.
- Romeis B. *Mikroskopische Technik.* 17th ed. Wien: Verlag Urban und Schwarzenberg; 1989.
- Rosenblum G, Meroueh SO, Kleifeld O, Brown S, Singson SP, Fridman R et al. Structural basis for potent slow binding inhibition of human matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *J Biol Chem.* 2003;278:27009-15.
- Salamonsen LA, Nagase H, Woolley DE. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors at the ovine trophoblast-uterine interface. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:29-37.
- Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* 1998;8:171-7.
- Sarges J, Heuwieser W, Schluns J, Drewes B. Immunohistological examination on the distribution of collagen types I, III, IV and V in bovine post partum placentomes. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1998;45:1-10.
- Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:145-60.
- Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D'Orazi G, Murphy AN et al. Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol.* 1993;156:235-46.
- Schnorr B. *Embryologie der Haustiere.* 3rd ed. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag Stuttgart; 1996.
- Schoon H-A. *Lungen- und Plazentareife beim Rind in der Endphase der Gravidität [Habilschr. med. vet].* Hannover: Tiho; 1989.
- Schoon H-A, Schoon D. Reifungsvorgänge der bovinen Plazentome in der Endphase der Trächtigkeit. *DVG 19th Congress; Giessen:* 1991. p. 67-80.
- Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod.* 1999;61:797-801.
- Schuler G, Wirth C, Teichmann U, Failing K, Leiser R, Thole H et al. Occurrence of estrogen receptor alpha in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod.* 2002;66:976-82.
- Schulz L-C, Grunert E. Physiologie und Pathologie der Involution des Rinderuterus. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1959;66:29-37.
- Schulz L-C, Merkt H. Morphologische Befunde an exstirpierten Plazentomen, zugleich ein Beitrag zur Ätiologie der Retentio secundinarum beim Rind. *Monatsh Veterinarmed.* 1956;11:712-4.

- Sevinga M, Barkema HW, Hesselink JW. Retained placenta in Friesian mares: incidence, risk factors, therapy, and consequences. *Pferdeheilkunde*. 2001;17:619-22.
- Sharpe KL, Eiler H, Hopkins FM. Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. *Biol Reprod*. 1990;43:229-35.
- Shemesh M. Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review. *Reprod Fertil Dev*. 1990;2:129-35.
- Sobiraj A. Untersuchungen zur Morphologie sowie zur Histochemie und Biochemie des Uterus bei Rindern in der frühen postpartalen Periode [Habilschr. med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachber. Veterinärmed.; 1992.
- Sobiraj A. Retentio secundinarum und andere postpartale Zwischenfälle bei der Stute. *Prakt Tierarzt, Coll Veterinarium*. 1996;26:67-9.
- Stelljes A. Immunhistologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung der Kollagentypen I, III und IV in den Fruchthüllen und der Uteruswand des Rindes [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo; 1998.
- Stevens RD, Dinsmore RP. Treatment of dairy cows at parturition with prostaglandin F2 alpha or oxytocin for prevention of retained fetal membranes. *J Am Vet Med Assoc*. 1997;211:1280-4.
- Strahl H. Zur Kenntnis der Wiederkäuerplacentome. *Ann Anat*. 1911;10:257-64.
- Takagi M, Fujimoto S, Ohtani M, Miyamoto A, Wijagunawardane MP, Acosta TJ et al. Bovine retained placenta: hormonal concentrations in fetal and maternal placenta. *Placenta*. 2002;23:429-37.
- Tefera N, Jeanguyot N, Thibier M, Humblot P. Pregnancy-specific protein B (bPSPB) and progesterone monitoring of post-partum dairy cows with placental retention. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2001;48:331-6.
- Tolhuysen I. Untersuchungen zur spontanen morphologisch-funktionellen Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität sowie modifizierte Effekte einer medikamentellen Geburtseinleitung auf des Endometrium und die Nebennieren [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo; 1990.
- Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC, Soloway PD, Wang Z, Bigg HF et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem*. 2000;275:41415-23.
- Tsumagari S, Kamata J, Takagi K, Tanemura K, Yosai A, Takeishi M. Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *J Reprod Fertil*. 1993;98:631-6.
- Ullmann MB, Reimers TJ. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *J Reprod Fertil Suppl*. 1989;37:173-9.
- Vagnoni KE, Zheng J, Magness RR. Matrix metalloproteinases-2 and -9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 of the sheep placenta during the last third of gestation. *Placenta*. 1998;19:447-55.

- Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC. Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta*. 1996;17:557-63.
- von Offenberg SN, Cummins PM, Birney YA, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain-induced endothelial MMP-2: role in vascular smooth muscle cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320:325-33.
- Walter I, Boos A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta*. 2001;22:473-83.
- Wessendorf G, Scheibl P, Zerbe PS. Effect of estrogens on the immune system with regard to bovine placental retention. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1998;105:32-4.
- Wiesner E. Nachgeburtsverhaltung beim Rind. In: Wiesner E, editor. *Handbuch der Tierärztlichen Praxis*. 1st ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2003. p. 594o-5h.
- Williams WF, Margolis MJ, Manspeaker J, Douglass LW, Davidson JP. Peripartum Changes in the Bovine Placenta Related to Fetal Membrane Retention. *Theriogenology*. 1987;28:213-23.
- Willms N. Morphometrische Untersuchungen zur spontanen und induzierten Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo; 1986.
- Wischral A, Verreschi IT, Lima SB, Hayashi LF, Barnabe RC. Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. *Anim Reprod Sci*. 2001;67:181-8.
- Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991;5:2145-54.
- Woicke J, Schoon HA, Heuwieser W, Schulz LC, Grunert E. Morphological and functional aspects of placental maturing mechanisms in the cow. 1. Light microscopic findings. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1986;33:660-7.
- Wooding FB. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*. 1992;13:101-13.
- Wooding FB. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta*. 1983;4 Spec No:527-39.
- Wooding FB, Beckers JF. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res*. 1987;247:667-73.
- Wooding FB, Morgan G, Monaghan S, Hamon M, Heap RB. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta*. 1996;17:75-86.
- Wooding FB, Wathes DC. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil*. 1980;59:425-30.



- Yamada O, Todoroki J, Kizaki K, Takahashi T, Imai K, Patel OV et al. Expression of prolactin-related protein I at the fetomaternal interface during the implantation period in cows. *Reproduction*. 2002;124:427-37.
- Yamamoto M, Nakagawa-Ueta H, Katoh N, Oikawa S. Decreased concentration of serum apolipoprotein C-III in cows with fatty liver, ketosis, left displacement of the abomasum, milk fever and retained placenta. *J Vet Med Sci*. 2001;63:227-31.
- Zaragoza C, Balbin M, Lopez-Otin C, Lamas S. Nitric oxide regulates matrix metalloprotease-13 expression and activity in endothelium. *Kidney Int*. 2002;61:804-8.
- Zdunczyk S, Ahlers D, Grunert E. [The relationship between bovine clinical mastitis at the time of parturition and retained placenta]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1992;99:386-9.
- Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H et al. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*. 2004;279:8592-601.
- Zoli AP, Demez P, Beckers JF, Reznik M, Beckers A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. *Biol Reprod*. 1992;46:623-9.



## 9 ANHANG

Tab. 9.1: Übersicht zur Anamnese der Tiere

Gruppe	Proben	Rasse	Alter in Jahren	Gest.-dauer in Tagen	Puerp.-verlauf	Allgemeinstörungen	Frucht kg/sex Zustand	Geburts-hilfe/-störung
I	A; B	sb	10	280	in toto	keine	44/m le	keine
I	A	sb	6,5	279	in toto	keine	45/w le	keine
I	A; B	sb	3,5	280	in toto	keine	39/m le	keine
I	A	rb	5	280	in toto	keine	47/w le	keine
I	A; B	sb	3,5	284	in toto	keine	?/? ?	keine
II	A; B	sb	3,7	265	Total-RS	keine	46/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A	sb	2,2	263	Total-RS	keine	40/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	2,2	223	Total-RS	keine	41/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	2	223	Total-RS	keine	45/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	ch	?	265	Total-RS	keine	38/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	?	265	Total-RS	keine	40/w ?	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	?	240	Total-RS	keine	25/m frt	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	6,5	265	Total-RS	keine	45/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	4	265	Total-RS	keine	40/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	6,5	265	Total-RS	keine	57/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	rb	3	270	Total-RS	keine	50/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	rb	3	270	Total-RS	keine	38/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	6,5	270	Total-RS	keine	46/? ?	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	2	270	Total-RS	keine	41/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	2,7	270	Total-RS	keine	55/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	2,5	270	Total-RS	keine	49/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	2,2	270	Total-RS	keine	36/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	9	270	Total-RS	keine	43/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	4,5	270	Total-RS	keine	42/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	4,5	275	Total-RS	keine	55/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	4,5	272	Total-RS	keine	47/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	5	270	Total-RS	keine	?/? le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	?	270	Total-RS	keine	43/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	6	270	Total-RS	keine	?/? le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A	sb	5,5	270	Total-RS	keine	45/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	sb	3	268	Total-RS	keine	48/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A	sb	3,5	270	Total-RS	keine	40/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A	sb	3	270	Total-RS	keine	40/w le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A	sb	2,7	270	Total-RS	keine	40/m le	S/PGF <sub>2α</sub>

Gruppe	Proben	Rasse	Alter in Jahren	Gest.-dauer in Tagen	Puerp.-verlauf	Allgemeinstörungen	Frucht kg/sex	Geburts-hilfe/-störung
II	A	sb	3	270	Total-RS	keine	40/m le	S/PGF <sub>2α</sub>
II	A; B	?	?	271	Total-RS	keine	?/? ?	S/PGF <sub>2α</sub>
III	A; B	ch	?	292	in toto	keine	59/? le	S/gr
III	A	sb	2,5	294	In toto	keine	53/m le	S/gr
III	A; B	sb	3,5	276	in toto	ggr.	50/m le	S/gr
III	A	sb	5	285	in toto	keine	57/m le	S/?
III	A	sb	3	285	in toto	keine	51/m le	S/?
III	A; B	sb	5,5	276	Total-RS	keine	55/m frt	S/?
III	A; B	sb	2	277	Total-RS	keine	46/mle	S/gr
III	A; B	sb	2,5	278	in toto	keine	52/m le	S/gr
III	A; B	rb	2,7	276	Total-RS	keine	45/m le	S/?
III	A; B	sb	3	275	Total-RS	ggr.	35/m le	K/so
III	A; B	sb	4,5	270	in toto	keine	48/? le	K/gr
III	A	sb	2,5	275	Total-RS	keine	44/m le	K/gr
III	A; B	sb	2,5	278	in toto	keine	42/w le	K/gr
III	A	sb	2,5	288	in toto	ggr.	40/w le	K/?
III	A; B	sb	3	280	Total-RS	keine	47/m le	K/gr
IV	A; B	sb	?	272	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	273	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	272	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	272	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	272	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	272	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	269	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>
IV	A; B	sb	?	269	Total-RS	keine	?	S/PGF <sub>2α</sub>

Legende zu Tab. 9.1:

Gest.dauer: Gestationsdauer

Puerp.verlauf: Puerperalverlauf

I: Kontrollgruppe

II: PGF<sub>2α</sub>-Gruppe

III: klinische Gruppe

IV: Versuchstiere

A: Entnahme zum Zeitpunkt der Geburt/Kaiserschnitt

B: Entnahme 24 Stunden post partum

in toto: komplikationsloser Nachgeburtsabgang

Total-RS: Retentio secundinarum totalis

S: Kaiserschnitt

PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandin F<sub>2α</sub>

K: konservative Geburtshilfe

w: weiblich

m: männlich

sb: schwarzbunt

rb: rotbunt

kg: Masse der Frucht

sex: Geschlecht der Frucht

gr: Fruchtgröße

Zustand le: lebende Frucht

Zustand frt: frisch tote Frucht

ggr.: geringgradig

?: unbekannt

so: sonstige

## 9.1 Verfahrensschritte der enzymhistochemischen Untersuchungen

### 9.1.1 Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase (CIAE)

1. Aufziehen von 3-4 µm dicken Schnitten Objektträger
2. Entparaffinierung und Rehydrierung  
10 min Roti<sup>®</sup>-Histol (Carl-Roth KG, Karlsruhe)  
2 x je 3 min Isopropanol  
3 min 96 % Alkohol  
3 min 80% Alkohol  
3 min 70% Alkohol  
3 min 50% Alkohol
3. Waschen in Aqua dest.
4. Herstellung der Substratlösung: 3,58 mg Naphthol-AS-D-Schlorazetat (Fa. Sigma Bioscience, Nr. 0758, München) in 0,9 ml Dimethylsulfoxid (Fa. Merck, Nr. 102952, Darmstadt) und 0,1 ml Triton X (Fa. SERVA, Nr. 37238, Heidelberg); lösen bis der klare gelbe Farbton verschwindet
5. Herstellung des Inkubationsmediums: 100 ml PBS (pH = 7,2) (9.3) + 0,5 ml Hexazoniumlösung (9.3); unter Schütteln 1ml Substratlösung hinzugeben (rosa Farbumschlag)
6. Inkubation der Schnitte 1,5 Stunden bei 37 °C im Inkubationsmedium
7. 10 min Spülen in Leitungswasser, dann 5 min in Aqua dest.
8. 5 min Gegenfärben in Mayer's Hämalun (9.3)
9. 10 min Bläuen in Leitungswasser, dann 5 min in Aqua dest.
10. auf einer Heizplatte bei 60°C trocknen
11. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe  
5 min Roti<sup>®</sup>-Histol  
5 min Roti<sup>®</sup>-Histol  
10 min Xylol
12. Eindecken der Objektträger mit Tissue-Tec<sup>®</sup> Coverfilm (Fa. Vogel, Nr. SA4770, Giessen)

## 9.2 Verfahrensschritte der Immunhistologie

### 9.2.1 Vorbehandlung

1. Aufziehen von 3-4 µm dicken Schnitten auf Super-Frost Plus Objektträger (Fa. Menzel-Gläser)  
30 min Trocknen bei Raumtemperatur vor einem Ventilator, anschließend Lagerung über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C
2. Entparaffinierung und Rehydrierung  
10 min Roti<sup>®</sup>-Histol (Carl Roth KG, Karlsruhe)  
2 x je 3 min Isopropanol  
3 min 96% Alkohol  
Inaktivierung der endogenen Peroxidase  
30 min in Methanol mit frisch zugesetztem 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Raumtemperatur (Perhydrol 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a., 7210, E. Merck, Darmstadt)
3. Waschen in TBS (9.3)

### 9.2.2 Besondere Verfahren

Vor dem Aufbringen der Objektträger auf die Coverplates wurde zunächst zum Nachweis der ER, PR sowie TIMP-2 Antigen eine Zitrat-Behandlung durchgeführt, während die Objektträger zum Nachweis von TIMP-1, Zytokeratin und Laminin mit Protease vorbehandelt wurden.

#### Zitrat-Behandlung

10 mM Zitratpuffer (9.3) pH 6,0 auf 96°C vorwärmen

1. 30 min Kochen der Schnitte in 96°C heißem Zitratpuffer
2. 30 min bei Zimmertemperatur abkühlen lassen
3. Spülen in TBS

#### Protease-Behandlung

5 min Spülen der Schnitte in PBS bei 37°C

1. 5 min Inkubieren der Schnitte in 0,05% Protease in PBS bei 37°C (bakterielle Protease Typ XXIV, P8038, Sigma Chemie, Deisenhofen)
2. 3 x 5 min Spülen der Schnitte in eiskaltem TBS

### 9.2.3 Antigennachweis mittels monoklonaler Antikörper nach der PAP-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates<sup>®</sup> (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Einbringen von je 100 µl des in 1% BSA (Bovines Serum Albumin, 3895 Boehringer, Mannheim) in TBS verdünnten Primärantikörpers (bzw. des Kontrollserums) in die Coverplates<sup>®</sup>  
Inkubation über Nacht bei 4°C
3. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate<sup>®</sup>
4. Einbringen von je 100 µl Ratte anti-Maus IgG 1:100 in 1% BSA in TBS je Coverplate<sup>®</sup> 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
5. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate<sup>®</sup>
6. Einbringen von je 100 µl Maus-PAP 1:500 in 1% BSA in TBS je Coverplate<sup>®</sup> 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
7. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate<sup>®</sup> und weiter mit 9.2.5

### 9.2.4 Antigennachweis mittels polyklonaler Antikörper nach der PAP-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates<sup>®</sup> (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Blocken der unspezifischen Bindungen mit 1:1 Schweineserum in TBS  
10 min bei Raumtemperatur
3. Einbringen von je 100 µl des in 20% Schweineserum in TBS verdünnten Primärantikörpers in die Coverplates<sup>®</sup>  
Inkubation über Nacht bei 4°C
4. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate<sup>®</sup>
5. Einbringen von je 100 µl Schwein anti-Kaninchen IgG 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate<sup>®</sup>  
30 min Inkubation bei Raumtemperatur

6. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate®
7. Einbringen von je 100 µl Kaninchen-PAP 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate®  
30 min Inkubation bei Raumtemperatur
8. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate® und weiter mit 9.2.5

### 9.2.5 Standard zur Nachbehandlung

1. Wechseln der Schnitte aus den Coverplates® in eine Küvette
2. 10 min Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in  
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit  
0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) in 0,1 M Imidazolpuffer (9.3) (pH 7,1) bei Raumtemperatur
3. 3 x 5 min Waschen in TBS bei Raumtemperatur
4. 5 min Waschen in Aqua dest. bei Raumtemperatur
5. 10 sec Gegenfärbung mit PAPANICOLAOUs Lösung (9.3) und 5 min Bläuen in Leitungswasser
6. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe  
5 min Roti®-Histol  
5 min Roti®-Histol  
10 min Xylol
7. Eindecken der Objektträger

### 9.2.6 Verwendete Antikörper und Seren

Die Primärantikörper, ihre Bezugsquellen sowie die verwendeten Verdünnungen sind der folgenden Übersicht zu entnehmen:

<u>Primärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<u>Monoklonal</u>		
Maus anti-Human Östrogenrezeptor Clone AER311	1:50	Ab-8 Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Maus anti-Human Progesteronrezeptor Clone PR4-12	1:10	GR18 AB-1 Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Taunus
Maus anti-Human Ki-67 Clone MM1	1:10	NCL-Ki-67-MM1 Medac GmbH, Wedel
Maus anti-Schwein Vimentin Clone V9. (1).	1:400	M 0725 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Human Desmin Clone D33	1:400	M 0760 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Human α-Aktin Clone 1A4. (1).	1:100	M 0851 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Zytokeratin-Pan Clone Lu5	1:20	1097652 Chemicon Int., Hofheim/Taunus
Maus anti-Human Kollagen Typ-IV	1:20	031502702

<u>Primärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<u>Monoklonal</u>		
Clone CIV22		Quartett, Berlin
Maus anti-Bovine TIMP-1	1:100	AF2310
Clone 7-6C1		Acria Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Maus anti-Human TIMP-2	1:400	Ab-5
Clone 3A4		Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
<u>Polyklonal</u>		
Kaninchen anti-MMP-2	1.400	Ab-7 Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Kaninchen anti-Laminin	1:100	L-9393 Sigma Bioscience, Deisenhofen
Kaninchen anti-Kollagen Typ I	1:20	NCL-COLL-L-Ip Medac GmbH, Wedel
Kaninchen anti-Bovine Kollagen Typ-III	1:1000	CL197P Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen

#### Schweineserum

Das von Schlachtschweinen stammende Serum wurde sterilfiltriert, zur Konservierung mit 0,05% Merthiolat versetzt und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

#### Sekundäre Antikörper

Als Sekundärantikörper für *monoklonale* Primärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 1% BSA in TBS verdünntes Ratte anti-Maus IgG (H&L, Code-Nr.: 415005100, Dianova GmbH, Hamburg) eingesetzt.

Als Sekundärantikörper für *polyklonale* Primärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 20% Schweineserum in TBS verdünntes Schweine anti-Kaninchen IgG (DAKO ZO196) verwendet.

#### Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Komplex

Als PAP-Komplex für die *monoklonalen* Primärantikörper diente eine 1:500 in 1% BSA in TBS verdünnte Maus-PAP (Code Nr. 223005025, Dianova Diagnostika GmbH, Hamburg).

Als PAP-Komplex für die *polyklonalen* Primärantikörper wurde eine 1:100 in 20% Schweineserum in TBS verdünnte Kaninchen-PAP (DAKO ZO113) eingesetzt.

#### Kontrollseren

Als Kontrollserum (Negativkontrolle) für die *monoklonalen* Antikörper aus der Maus wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenantigen von Hühner-Bursa-Lymphozyten (T1; HIRSCHBERGER 1987) verwendet.

Als Negativkontrolle für die *polyklonalen* Antikörper aus dem Kaninchen wurden die Schnitte jeweils parallel mit normalen Kaninchenserum (DAKO X0902) inkubiert.



### 9.3 Lösungen und Puffer

#### **Weigerts Hämatoxylin-Lösung**

##### Lösung A:

3 g Hämatoxylin (Fa. Fluka, Taufkirchen, Nr. 51260)

300 ml 96%igen Ethanol

vermischen und 24 Stunden reifen lassen

##### Lösung B:

12 ml 29% wässrige Eisen-3-Chlorid-Lsg. (Fa Merck, Darmstadt, Nr. 103943)

3 ml 25%ige HCL

285 ml Aqua dest

vermischen

Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen

#### **Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)**

##### Stammlösung:

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, 48552)

610 ml Aqua dest.

390 ml HCl 1 N (Merck, 109970)

##### Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8% NaCl (Merck, 106400) in Aqua dest.

#### **Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,2, 300 mOsm)**

##### Stammlösung:

42 g NaCl krist. (Merck, 106400)

9,26 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O p.a. (Merck, 106580)

2,15 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, 105104)

Aqua bidest. ad 100 ml

##### Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in Aqua bidest.

#### **Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)**

##### Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure (Merck, 100247)

(21,01 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O in 1000 ml Aqua dest.)

##### Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat (Merck, 106448)

(29,41 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O in 1000 ml Aqua dest.)

##### Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen

#### **Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)**

6,81 g Imidazol (Merck, 104716)

Aqua dest. ad 1000 ml

Zugabe von 500 ml 0,1 M HCl

**Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB)**

100 mg DAB (Fluka 32750) in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer)

Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Merck, 107210) zugeben

**PAPANICOLAOUs Lösung**

PAPANICOLAOUs Lösung (Merck, 109254) und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

**Merthiolat Gebrauchslösung**

10 g Ethylenmercurithiosalicylsäure Na-Salz (Merthiolat) (Sigma, T 5125)

100 ml 0,8% NaCl (Fa. Merck, Nr. 106400, Darmstadt)

**Hexazoniumlösung**

50 mg Pararosanilin (Fa. Sigma, Nr. 3750, München) in 3 ml 1 N HCL unter Kühlung tropfenweise lösen

0,5 ml 1 M Natriumnitritlösung (69 mg auf 1 ml) (Fa. Merck, Nr. 6549, Darmstadt) zugeben

mischen bis der braune Farbumschlag gelbbraunlich wird

nach 5 min verwendbar

**Mayer's Hämatoxylin**

1 g Hämatoxylin (Fa. Merck, Nr. 4305, Darmstadt), 0,2 g Natriumjodat (Fa. Riedel de Haen, Nr. 03128, Seelze) und 50 g Kaliumaluminiumsulfat (Fa. Merck, Nr. 1042, Darmstadt) in 1 l Aqua dest. auf ca. 75 °C erwärmen

50 g Chloralhydrat (Fa. Merck, Nr. 2425, Darmstadt) und 1 g Zitronensäure (Fa. Riedel de Haen, uNr. 33114, Seelze) hinzugeben

filtrieren

#### 9.4 Bilddokumentation

**Makroskopische und histologische Befunde** an Plazentomen von Kühen der **Gruppe I** (termingerechte Spontangeburt, ungestörter Nachgeburtsabgang, **A**) und **Gruppe II** (vorzeitig eingeleitete Geburt, klinische Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung, **B**)  
Befunderhebung zum Zeitpunkt der Geburt/Section caesarea:

##### Abb. 9.1: Makroskopische Befunde

**A** (Gruppe I):

Querschnitt einer Karunkel (Placenta materna) nach ungestörtem Abgang der Secundinae, formalinfixiert; **Karunkelbasis (K)**, **periphere Bindegewebssepten** (Pfeil)

**B** (Gruppe II):

natives Plazentom, **vollständig von Placenta fetalis umgeben** mit klinischer Diagnose einer **Retentio secundinarum**

##### Abb. 9.2: Histologische Befunde im Bereich der Peripherie des Plazentoms (Krypten)

**A** (Gruppe I):

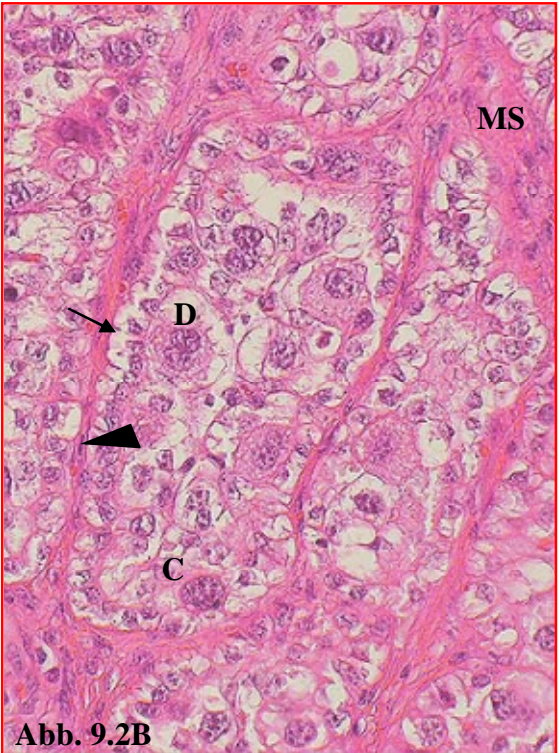
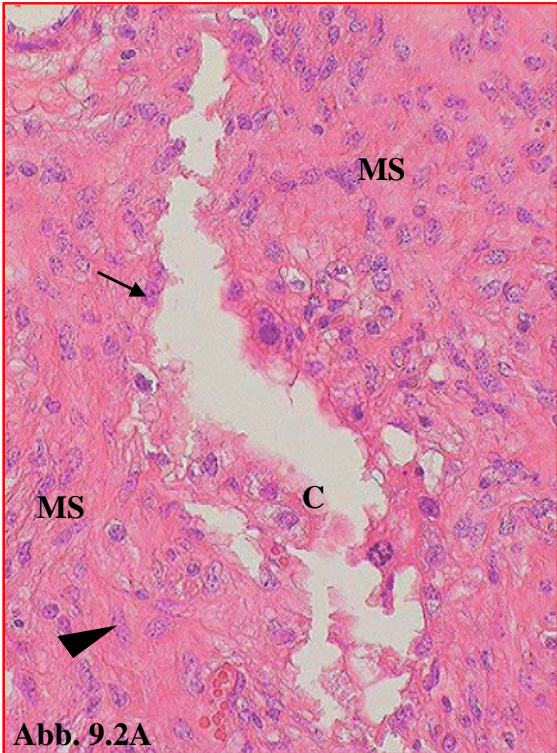
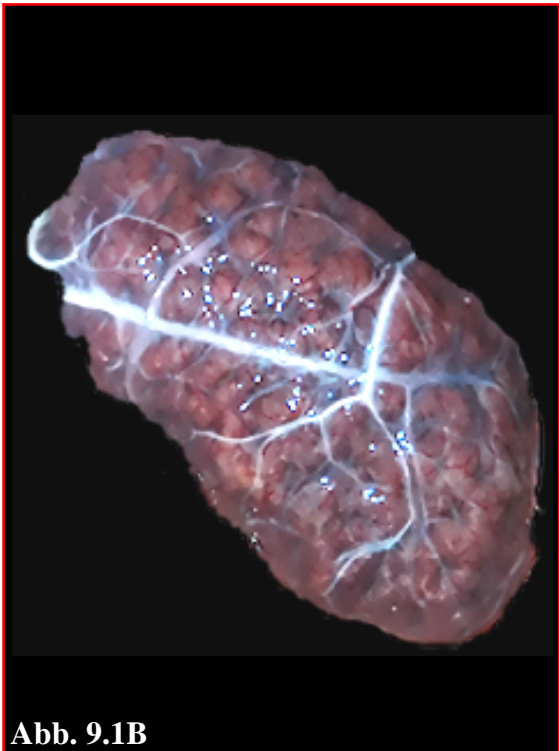
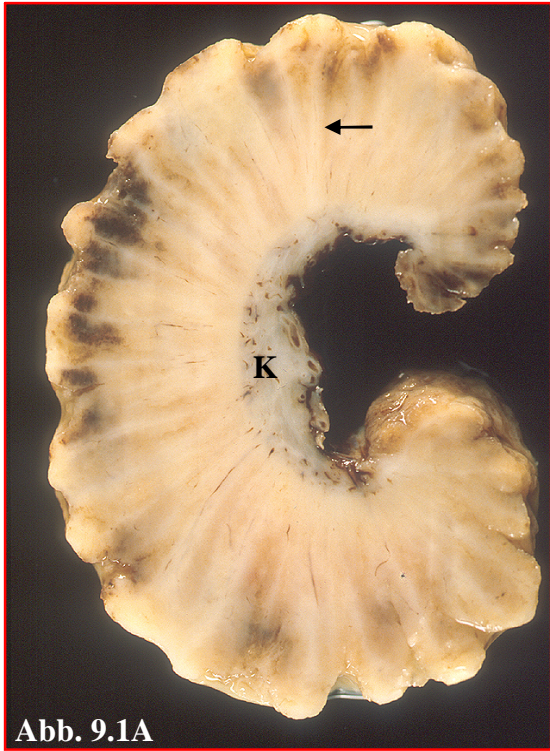
Weitgehende **Desintegration** und numerische **Reduktion** des maternalen **Kriptenepithels** (Pfeil); einzelne abgelöste Chorionepithelgruppen (C), **deutliches Ödem** des maternalen Stromas (MS) mit **metabolisch aktiven Stromazellen** (Pfeilspitze)

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

**Isoprismatisches bis kubisches** maternales **Kriptenepithel** (Pfeil), **geschlossene Chorionepithelverbände** (C), **sehr zahlreiche Diplokaryozyten** (D), **kein Ödem** des maternalen Stromas (MS), **metabolisch inaktive, schlanke Stromazellen** (Pfeilspitze)

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x



**Immunhistologische Befunde** an Plazentomen von Kühen der **Gruppe I** (termingerechte Spontangeburt, ungestörter Nachgeburtsabgang, **A**) und **Gruppe II** (vorzeitig eingeleitete Geburt, klinische Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung, **B**)

Befunderhebung zum Zeitpunkt der Geburt/Section caesarea:

### **Abb. 9.3: Peripherie des Plazentoms (Krypten)**

**A** (Gruppe I):

**Deutliche** intrazytoplasmatische **TIMP-2-Expression** der **Diplokaryozyten (D)**; Chorionepithel (C), maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, TIMP-2, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**Inset:**

**Deutliche** intrazytoplasmatische **Lamininexpression** der wenigen **Diplokaryozyten (Pfeilspitze)**, **kontinuierliche Laminin-positive** epitheliale **Basallamina (Pfeil)**

Immunhistologie, Laminin, Normarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

**Deutliche** intrazytoplasmatische **TIMP-2-Expression** der sehr zahlreichen **Diplokaryozyten (D)**; Kryptenepithel (K), Chorionepithel (C), maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, TIMP-2, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**Inset:**

**Deutliche** intrazytoplasmatische **Lamininexpression** der **Diplokaryozyten (Pfeilspitze)**; **Laminin-negative**, bzw. **schwach** und **diskontinuierlich Laminin-positive** epitheliale **Basallamina (Pfeil)**

Immunhistologie, Laminin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

### **Abb. 9.4: Basis des Plazentoms (Stiel)**

**A** (Gruppe I):

Diffuse **mittel- bis hochgradige** intrazytoplasmatische **Desminexpression** des maternalen, aufgelockerten, weitmaschigen (ödematisierten) **Stromas (MS)**

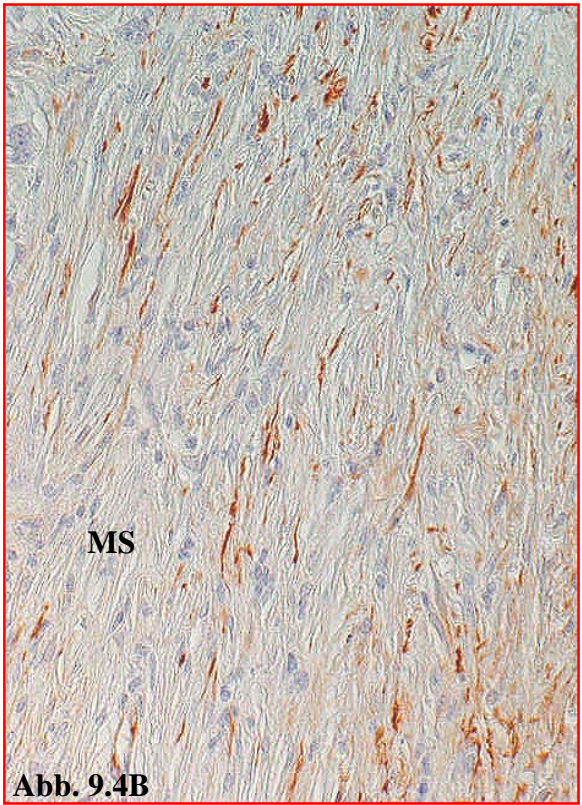
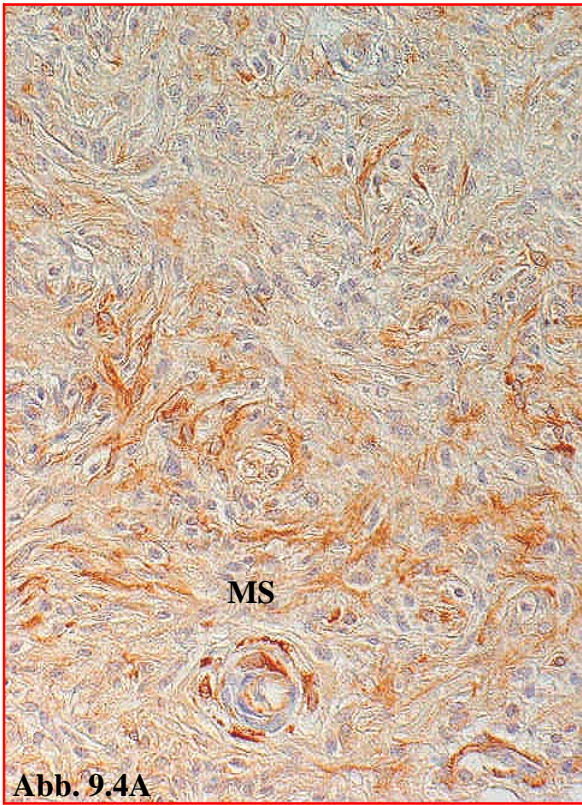
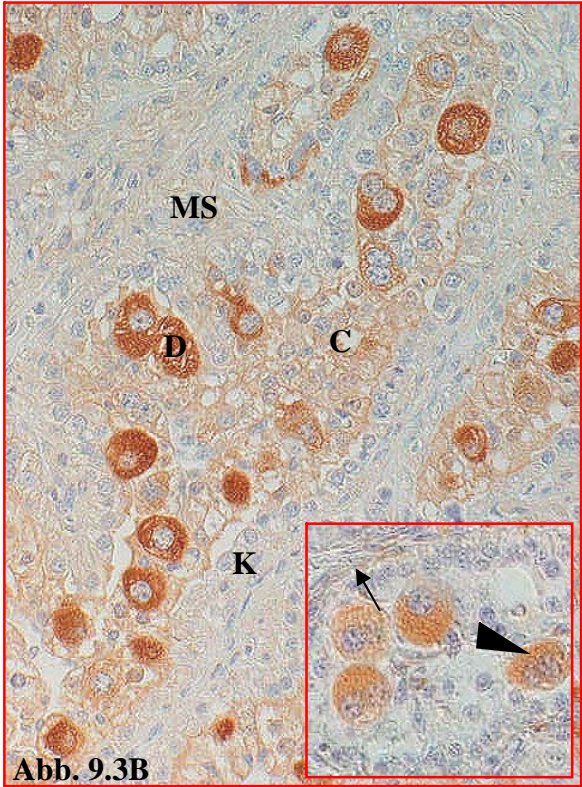
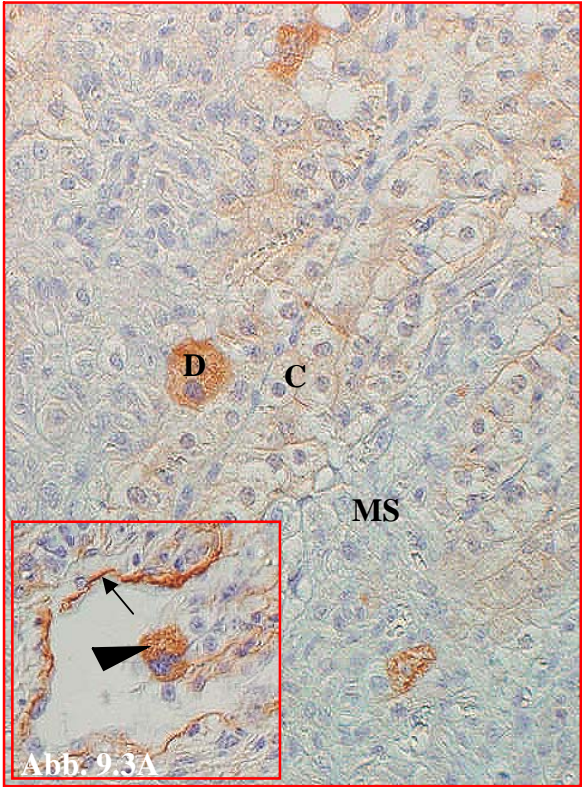
Immunhistologie, Desmin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

Multifokale **mittelgradige** intrazytoplasmatische **Desminexpression** des maternalen **Stromas (MS)**, bestehend aus lang gestreckten, schlanken (nicht ödematisierten) Zellen

Immunhistologie, Desmin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x





**Immunhistologische Befunde** an Plazentomen von Kühen der **Gruppe I** (termingerechte Spontangeburt, ungestörter Nachgeburtsabgang, **A**) und **Gruppe II** (vorzeitig eingeleitete Geburt, klinische Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung, **B**)

Befunderhebung zum Zeitpunkt der Geburt/Section caesarea:

**Abb. 9.5: Östrogenrezeptorverteilung in Epithel und Stroma der Peripherie des Plazentoms**

**A** (Gruppe I):

Multifokale **schwache** intranukleäre Expression der **Östrogenrezeptoren** im **Chorionepithel (C)** und den **Diplokaryozyten (D)**; maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, Östrogenrezeptoren, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

Multifokale bis diffuse **gering- bis mittelgradige** intranukleäre Expression der **Östrogenrezeptoren**, vorwiegend im maternalen **Kryptenepithel (Pfeil)**, vereinzelt im **Chorionepithel (C)**, **nicht** in den **Diplokaryozyten (D)**; maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, Östrogenrezeptoren, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**Abb. 9.6: Progesteronrezeptorverteilung im Stroma der Plazentombasis (Stiel)**

**A** (Gruppe I):

Diffuse **geringgradige** intranukleäre Expression von **Progesteronrezeptoren** in maternalen **Stromazellen (MS)**; Chorionepithel (C)

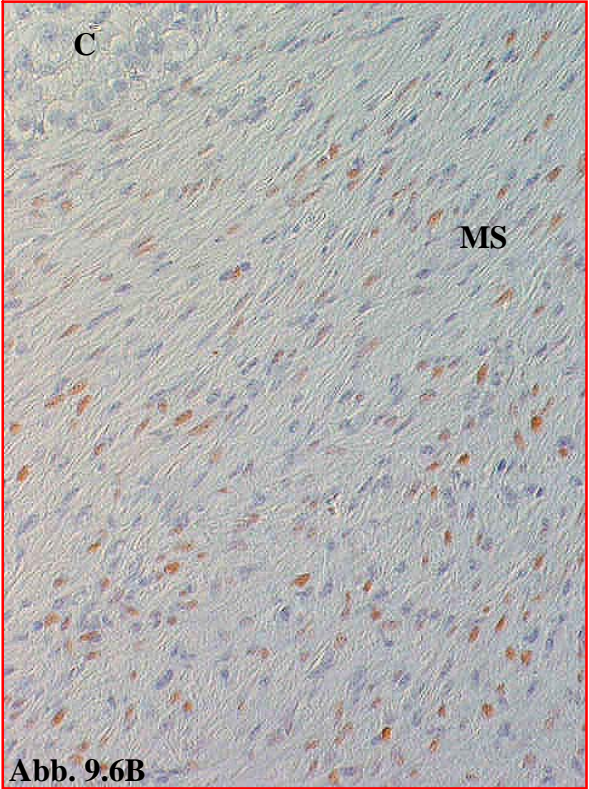
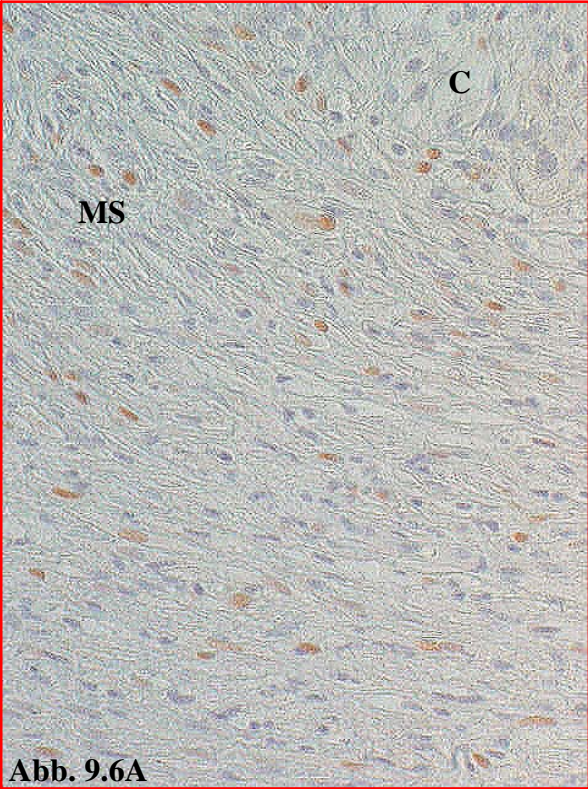
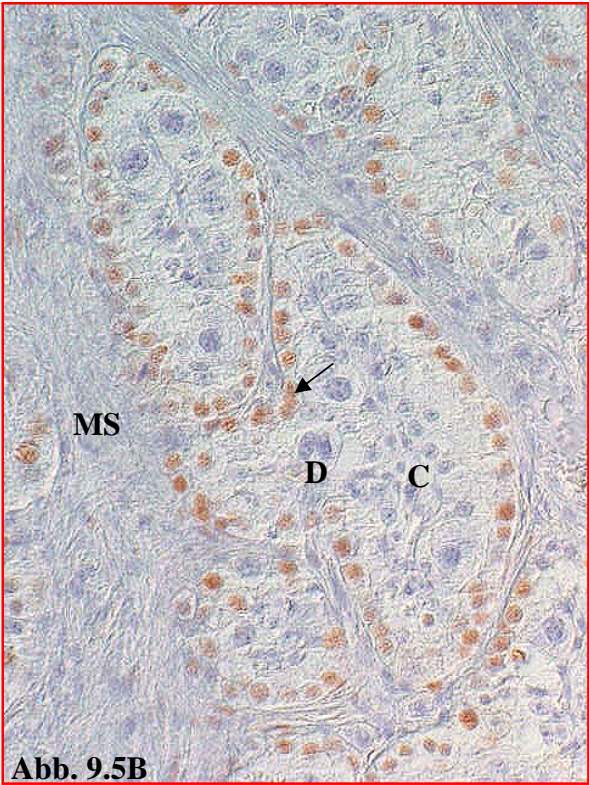
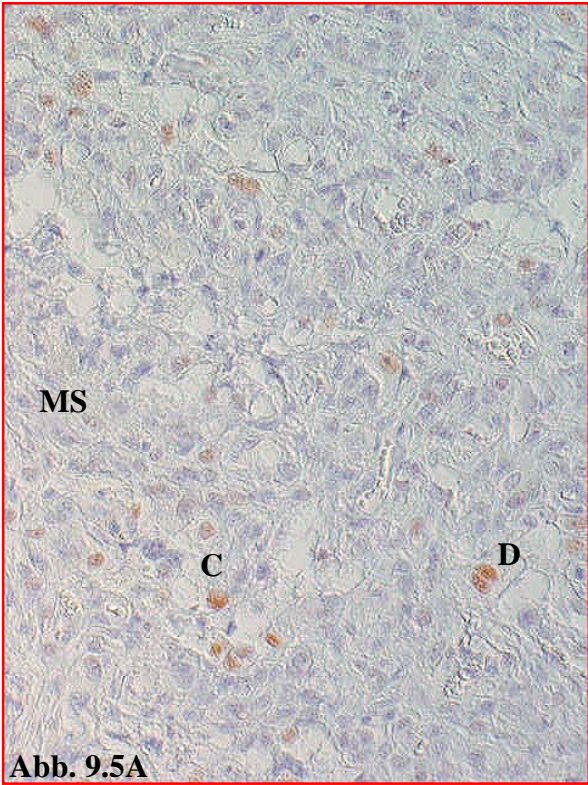
Immunhistologie, Progesteronrezeptoren, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

Diffuse **gering- bis mittelgradige** intranukleäre Expression von **Progesteronrezeptoren** in maternalen **Stromazellen (MS)**; Chorionepithel (C)

Immunhistologie, Progesteronrezeptoren, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x







**Immunhistologische Befunde** an Plazentomen von Kühen der **Gruppe I** (termingerechte Spontangeburt, ungestörter Nachgeburtsabgang, **A**) und **Gruppe II** (vorzeitig eingeleitete Geburt, klinische Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung, **B**)

Befunderhebung zum Zeitpunkt der Geburt/Section caesarea:

**Abb. 9.7: MMP-2-Nachweis in der Peripherie des Plazentoms**

**A** (Gruppe I):

Diffuse **mittel- bis hochgradige** extrazelluläre (**fetales Stroma, FS**) sowie multifokal **geringgradige** intrazytoplasmatische (**Chorionepithel, C**) **MMP-2-Expression**; maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, MMP-2, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

Multifokale **mittelgradige** extrazelluläre (**fetales Stroma, FS**) **MMP-2-Expression**; Diplokaryozyten (D), Kryptenepithel (Pfeil), maternales Stroma (MS), (Chorionepithel, C)

Immunhistologie, MMP-2, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**Abb. 9.8: TIMP-1-Nachweis in der Peripherie des Plazentoms**

**A** (Gruppe I):

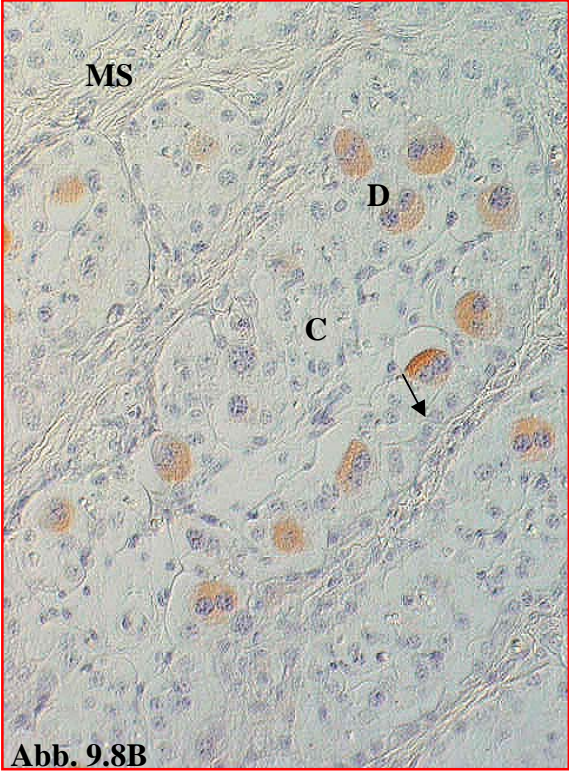
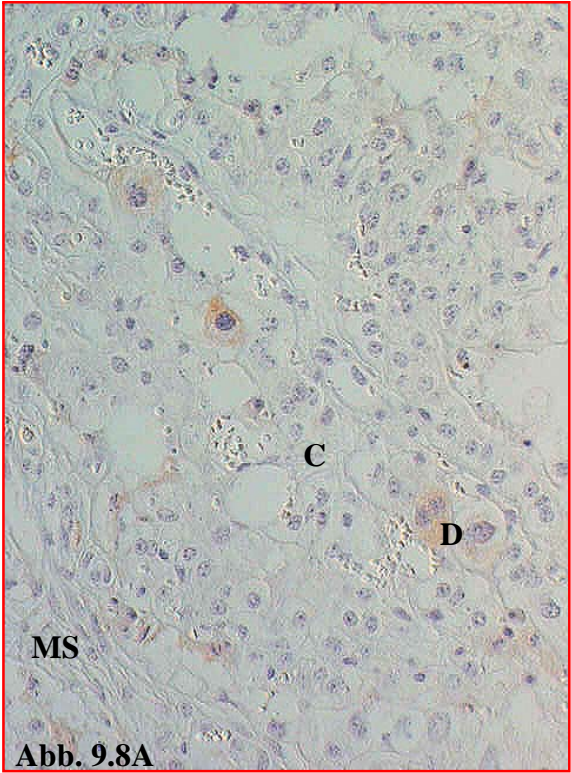
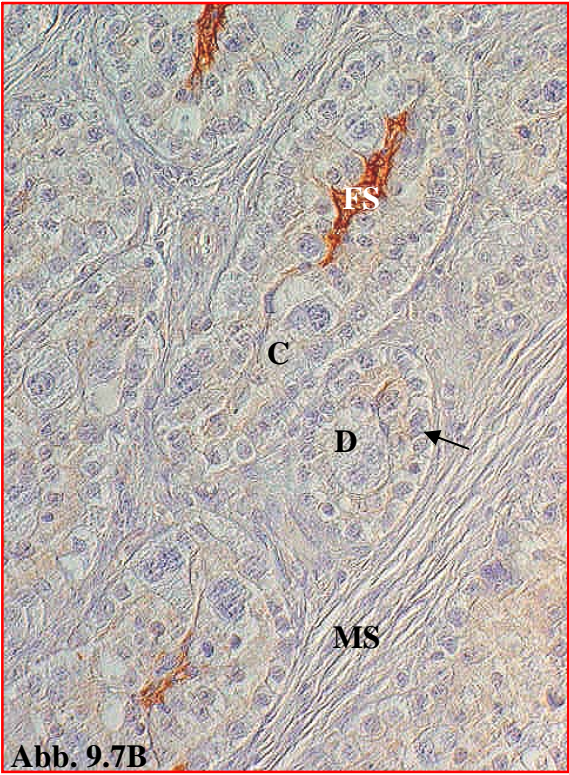
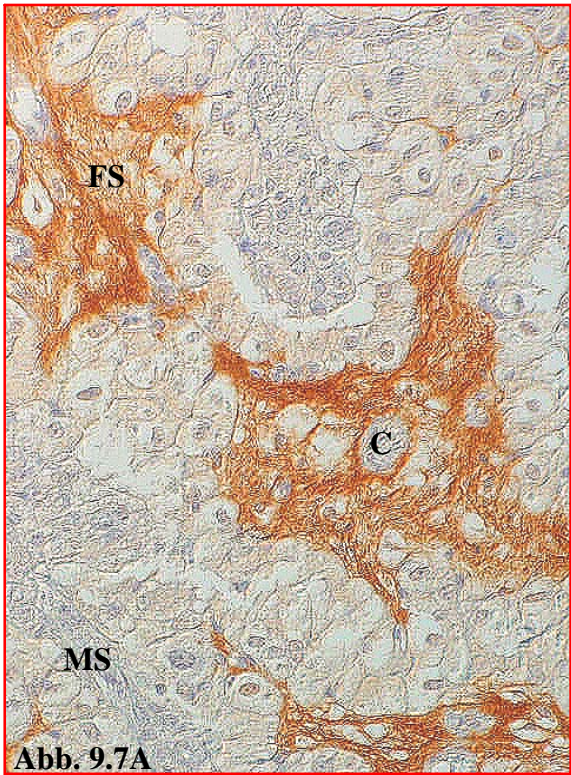
Vereinzelte **geringgradige** intrazytoplasmatische **TIMP-1-Expression** der **Diplokaryozyten (D)**; Chorionepithel (C), maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, TIMP-1, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

**B** (Gruppe II):

Multifokale **mittelgradige** intrazytoplasmatische **TIMP-1-Expression** der **Diplokaryozyten (D)**; Kryptenepithel (Pfeil), Chorionepithel (C), maternales Stroma (MS)

Immunhistologie, TIMP-1, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x





## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Schoon** für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, für die hervorragende fachliche Betreuung und nicht minder für die stets freundschaftliche und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Auch bei **Frau Dr. Schoon** möchte ich mich sehr herzlich für ihre unermüdliche fachliche Unterstützung und freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Sobiraj** und **Prof. Dr. Zerbe** für die freundliche Überlassung des Probenmaterials sowie ihre stetigen klinisch-fachlichen Hilfestellungen und Bemühungen.

Ein ganz spezieller Dank geht an **Heike** für ihre Geduld und Nervenstärke, mich in die Geheimnisse des wissenschaftlichen Arbeitens einzuweihen und mein Dissertationsvorhaben auf dem richtigen Weg zu halten.

Dem gesamten Patho-Team gilt ein riesiges Dankeschön für über drei Jahre unvergesslicher, schöner Zusammenarbeit: Den Damen aus dem Labor, **Frau Herzog**, **Frau Schleinitz**, **Frau Pleitz** und **Frau Langhoff**, für ihre unermüdliche Unterstützung bei allen histologisch-technischen Problemen, den Herren aus der Halle, **Lars**, **Bernd** und **Ralf**, den besten Helfern und Rettern beim Sezieren, aber auch weit darüber hinaus.

Ganz speziell geht ein herzliches Dankeschön an **Wippi**, für ihre unersetzliche Unterstützung und unermüdliche Hilfe unter anderem bei der Erstellung meiner Immunhisto, aber mindestens genauso für ihre freundschaftliche, ja teils liebevoll-mütterliche Anteilnahme in jeder Promotionslage.

Liebe **Elli**, neben dir als eine fachlich unbezahlbar hilfreiche und engagierte Kollegin, mit Einsatz und Aufopferung weit über die Maßen hinaus, habe ich in Dir auch eine echte Freundin aus meiner Patho-Zeit lieb gewonnen.

Diese „Ehre“, liebe **Anne**, kann Dir somit nicht mehr zuteil werden, aber auch nur, weil Du mit mir bereits im Studium jede Menge „Freud und Leid“ geteilt hast („WG- und Arbeitsgenossen“, DISS.

---

REISCHAUER 2006), wofür ich Dir von ganzem Herzen dankbar bin (das gilt selbstverständlich auch uneingeschränkt für **Paula!**).

Nicht vergessen möchte ich all die lieben, hilfreichen **Mitdoktoranden** meiner Patho-Zeit, mit denen das Arbeiten im Institut richtig Spaß gemacht, es war eine tolle, unvergessliche Zeit!

Bleibt noch, mich bei denen zu bedanken, die ich am meisten liebe, und die mir, häufig im Stillen, die Kraft und den Rückhalt gegeben haben, diese Arbeit fertig zustellen: **Meiner Familie** und meinem **Ninsche!**